

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal II



TESIS DOCTORAL

**Estudio biológico y anatomopatológico del tumor solido de
Ehrlich injertado a ratones sometidos a quimioterapia
simple y multiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jose Maria Nieto Martinez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal II

TP
1988
335



x - 53-123190-8

**ESTUDIO BIOLOGICO Y ANATOMOPATOLOGICO
DEL TUMOR SOLIDO DE EHRLICH INJERTADO A
RATONES SOMETIDOS A QUIMIOTERAPIA
SIMPLE Y MULTIPLE**



José María Nieto Martínez

Madrid, 1988

Colección Tesis Doctorales. N.º 335/1988

© José María Nieto Martínez

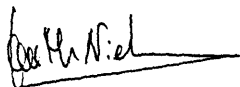
**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 - 28015 Madrid
Madrid, 1988
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-22906-1988**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

STUDIO BIOLOGICO Y ANATOMOPATOLOGICO DEL TUMOR SOLIDO DE EHRLICH
INJERTADO A RATONES SOMETIDOS A QUIMIOTERAPIA SIMPLE Y MULTIPLE

Trabajo presentado para aspirar
al grado de Doctor en Veterinaria

Madrid, Diciembre de 1.986



Fdo. José María Nieto Martínez

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Principios generales de la quimioterapia antitumoral.....	4
1.1.1. El Ciclo celular.....	4
1.1.2. Sistemática de empleo de las drogas antitumorales.....	6
1.1.3. Resistencias de los tumores a las drogas.....	7
1.1.4. Poliquimioterapia.....	8
1.1.5. Fármacos antineoplásicos.....	9
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	13
2.1. Cisplatino.....	13
2.2. Bleomicina.....	21
2.3. Carcinoma de Ehrlich.....	28
2.4. Marcadores Tumorales.....	34
3. MATERIAL Y METODOS.....	39
3.1. Animales de experimentación.....	39
3.2. Tumor ascítico original.....	40

3.3. Implante de la forma ascitica.....	41
3.4. Trasplante de la forma sólida.....	42
3.5. Antiblásticos.....	43
3.6. Protocolo de trabajo.....	43
3.7. Sacrificios.....	45
3.8. Controles.....	45
3.9. Necropsias.....	47
3.10. Toma de muestras.....	47
3.11. Inclusión.....	49
3.12. Cortes histológicos.....	49
3.13. Tinciones.....	50
3.14. Estudio estadístico.....	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1. Estado general, control de supervivencia....	52
4.2. Comprobación del prendimiento de los implantes.....	53
4.3. Evolución del peso de los animales.....	55
4.4. Estudio de los volúmenes tumorales.....	56
4.5. Estudio anatomopatológico de los tumores.....	60
4.6. Estudios inmunohistoquímicos del tumor de Ehrlich.....	79

4.7. Estudio ultraestructural.....	80
4.8. Determinaciones hematológicas.....	84
4.9. Estudio estadístico de los resultados.....	87
5. DISCUSION.....	96
5.1. Supervivencia.....	96
5.2. Estado de los animales.....	97
5.3. Metástasis.....	98
5.4. Volúmenes tumorales.....	99
5.5. Estudio anatomopatológico.....	100
5.6. Mitosis.....	106
5.7. Estudio ultraestructural.....	107
5.8. Actividad antitumoral del Cisplatino en el Carcinoma Sólido de Ehrlich.....	109
5.9. Actividad antitumoral de la Bleomicina en el Carcinoma Sólido de Ehrlich.....	111
5.10. Actividad antitumoral de la combinación Cispla- tino+Bleomicina en el Carcinoma Sólido de Ehrlich.....	112
6. CONCLUSIONES.....	113

7. RESUMEN.....	114
8. SUMMARY.....	115
10. BIBLIOGRRRAFIA.....	118
11. AGRADECIMIENTOS.....	158
12. TABLAS, GRAFICAS E ICONOGRAFIA.....	160

INTRODUCCION

La investigación oncológica es, en la actualidad, una de las áreas científicas de mayor interés, dentro de ella el Cáncer, término con el que se denominan las neoplasias epiteliales malignas, representa un campo de gran notoriedad donde se desarrollan numerosas investigaciones encaminadas a conocer de forma definitiva la enfermedad en sus diversos aspectos etiológicos, biopatológicos, diagnósticos y terapéuticos.

Los modelos experimentales son el campo donde se ensayan los procedimientos terapéuticos y donde se profundiza en las diversas acciones que desarrollan los fármacos. Los resultados obtenidos pueden aplicarse tanto a la Medicina Humana como a la Medicina Veterinaria.

En nuestro caso hemos utilizado a nivel experimental la forma sólida del adenocarcinoma mamario del ratón Suiss denominado por LOEWENTAL y JHAN "Tumor de Ehrlich" (30). Las características anatomopatológicas del tumor, su modo de crecimiento y la posibilidad de conseguir grupos homogéneos en edad, peso y mantenimiento de los animales justifican la elección de este modelo experimental en el que hemos trabajado.

El adenocarcinoma mamario del ratón Suiss fué aislado por EHRLICH y APOLANT en el año 1.905; desde este año han sido numerosas las aportaciones que sobre su morfología y biopatología se han realizado (30).

Nuestro trabajo estudia diversos aspectos de un protocolo de quimioterapia antiblástica sobre el citado tumor. Esta especialidad es de gran interés en el tratamiento de los tumores y principalmente en aquellos de difícil control mediante otras terapéuticas o en la prevención de metástasis de los que han sido extirpados quirúrgicamente.

La asociación de varios fármacos antitumorales en un protocolo de tratamiento supone una mayor efectividad en los resultados, a la vez que provoca menor número de efectos secundarios indeseables(69).

En nuestro estudio hemos empleado la conjugación de dos fármacos: Cisplatino y Bleomicina, ambos de frecuente utilización en la terapéutica oncológica actual, tanto clínica como experimentalmente.

El objetivo propuesto para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de las modificaciones macroscópicas, microscópicas, histoquímicas, e inmunohistoquímicas de los carcinomas de Ehrlich injertados en ratones y tratados con los antitumorales antes citados en quimioterapia simple y poliquimioterapia. De esta manera continuamos la línea de investigación que sobre Oncología Experimental se viene desarrollando en el Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid desde el año 1.970 (31, 32, 35, 36, 37, 38).

4

. Finalmente realizaremos un análisis completo de aquellos aspectos de la Oncología que nos han servido de base en el desarrollo y estudio de nuestro modelo experimental.

PRINCIPIOS GENERALES DE LA QUIMIOTERAPIA ANTIBLASTICA

EL CICLO CELULAR

El ciclo celular puede ser definido como una secuencia ordenada de sucesos que transcurren en el intervalo de tiempo comprendido entre una división celular y la próxima división (69, 121). El conocimiento del ciclo celular ayuda de manera importante en el planteamiento de un protocolo de quimioterapia antiblastica.

Tradicionalmente se han descrito cinco fases en el ciclo celular (69):

1. Mitosis, o fase M de división

2.Fase G₁, periodo durante el cual se sintetiza RNA y proteínas.

3.Fase S, o de síntesis de DNA

4.Fase G₂, que consiste en un segundo periodo de replicación de RNA y síntesis de proteínas.

5.Fase G₀, de reposo o inactividad.

Las células que se dividen rápidamente son las más susceptibles a la acción de las drogas antineoplásicas (117).

Atendiendo al mecanismo de acción los fármacos antimitóticos se han clasificado como sigue (56):

-Drogas ciclodependientes, que interfieren específicamente alguna de las fases del ciclo.

-Drogas cicloindependientes, que pueden actuar en

cualquier fase del ciclo sin modificarle.

SISTEMATICA DE EMPLEO DE LAS DROGAS ANTINEOPLASICAS.

Previamente al tratamiento quimioterápico debe realizarse una minuciosa valoración clínica y biopatológica del enfermo canceroso.

Hess en 1.977 (69) recomienda el uso de un estricto protocolo en la aplicación de antiblasticos en enfermos cancerosos, y que transcribimos a continuación por considerarlo de gran interés:

- Debe realizarse un estudio histológico de la enfermedad y conocer su sensibilidad a la droga.
- Se aplicará la dosis correcta y el protocolo adecuado para cada enfermo canceroso
- Se realizará un riguroso control periódico de los efectos tóxicos

-Finalmente, se valorará la respuesta del tumor al tratamiento

RESISTENCIA DE LOS TUMORES A LAS DROGAS

Uno de los hechos limitantes de la quimioterapia antitumoral consiste en la aparición de resistencias al tratamiento.

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia destacando, entre otros, los siguientes (121):

- Desarrollo de una vía metabólica alternativa que elabore los mismos productos que la vía bloqueada.
- Reparación espontánea del daño inducido por el fármaco.
- Modificaciones de la permeabilidad celular, de manera que se inhiba el paso del agente

antiblastico al interior de la célula.

- Diferenciación celular, los tumores de células especializadas presentan mayor resistencia al tratamiento medicamentoso

Los mecanismos anteriormente citados no son privativos de las células neoplásicas, sino que también se desarrollan en las células de tejidos sanos generalmente con mayor intensidad. Este hecho explica la disminución de los efectos tóxicos que se observa en ciclos posteriores de tratamiento.

- Las barreras anatómicas que impiden el acceso del fármaco al tumor contribuyen a crear resistencias a las drogas. Tal sería el caso de ciertos tumores del Sistema Nervioso Central o de aquellos en los que la irrigación es insuficiente.

POLIQUMIOTERAPIA

En el año 1.550 a. de C., los egipcios mezclaban

fármacos para mejorar los efectos curativos en el tratamiento de enfermedades malignas. Desde entonces la combinación de sustancias con fines terapéuticos se ha realizado con frecuencia, si bien hasta finales del siglo XIX no se desarrollaron bajo criterios científicos.

La poliquimioterapia antitumoral está basada en los tres principios que a continuación se enuncian (121):

- La fracción de células neoplásicas afectadas por cada droga es independiente
- Pueden asociarse fármacos con diferentes mecanismos de acción para que los efectos sobre el tumor sean aditivos o sinérgicos.
- Cada una de las drogas puede tener efectos tóxicos distintos y no aditivos a los efectos secundarios de los otros fármacos.

FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

El motivo fundamental de este apartado consiste en

presentar al lector una visión global de los fármacos empleados en la terapéutica antitumoral agrupados según su mecanismo de acción. Algunas de las citas reseñadas en el capítulo bibliográfico estudian en profundidad estos aspectos (59).

Antimetabolitos.

Los antimetabolitos inhiben una vía metabólica esencial para la supervivencia o reproducción de las células cancerosas.

Pertenecen a este grupo: Metotrexato, 6-Mercaptopurina, 6 Tioguanina, Citarabina, 5-Fluoracilo y Dacarbacino.

Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes reaccionan con el DNA, RNA y ciertos enzimas. Todos ellos son tóxicos para la médula ósea, provocan inmunodepresión y mutagénesis.

Las mostazas nitrogenadas fueron los primeros fármacos alquilantes utilizados, ya que se comprobó que los individuos sometidos a grandes dosis de gas mostaza durante la Primera Guerra Mundial mostraban lesiones en la médula ósea. Otras drogas de este grupo son Metocloretina, Trimetilamina, Tiotepa, Clorambucil, Melfalán, Carmustina, Lomustina, Ciclofosfamida, Busulfán, Dibromotiazol y Estreptozaotina.

Antibióticos

Pertenecen a este grupo drogas cuyas fórmulas químicas y mecanismos de acción son diversos, siendo todos ellos productos derivados del metabolismo microbiano.

Los principales antibióticos antitumorales y sus descubridores se relatan en la revisión bibliográfica de la Bleomicina.

Agentes antimitóticos

Provocan la interrupción de la mitosis en la

metafase, e interfieren la síntesis del RNA de transferencia, probablemente actuando como agentes acilantes.

Los antimitóticos de mayor uso son la Vincristina y la Vinblastina.

Otros compuestos cuyo mecanismo de acción no puede incluirse en los grupos anteriores serían la Procarbina, Hidrasiurea, Asparaginasa, Corticosteroides, Mitotane y Cisplatino.

REVISION BIBLIOGRAFICA

CISPLATINO

a) Composición química y mecanismo de acción

El Cisplatino, químicamente conocido como Cis-diaminocloro-platinum I, es un compuesto soluble en agua que tiene un átomo central de platino rodeado por dos de Cl^- y dos de NH_3 (Fig. 1).

Los átomos de cloro están unidos al platino mediante enlaces lábiles y pueden ser reemplazados por otras moléculas (131). En el plasma sanguíneo, dado que la concentración de iones Cl^- es relativamente alta, 103 mM, el Cisplatino permanece eléctricamente estable. Sin embargo, una vez que atraviesa la membrana celular y la concentración de Cl^- disminuye, los iones Cl^- son reemplazados por moléculas de agua resultando compuestos cargados positivamente; dichos compuestos pueden

reaccionar con otras moléculas de manera análoga a como actúan los agentes alquilantes (184)

Las uniones del Pt y los radicales $-NH_2$ son notablemente más estables que las de los iones Cl, por lo que apenas existen reacciones entre los radicales $-NH_2$ y las biomacromoléculas (184).

El DNA es la macromolécula sobre la que actúa básicamente el Cisplatino. Rosemberg et al, en 1969 (138) indican que impide en las bacterias la división celular; posteriormente otros investigadores demostrarían que reduce la capacidad de acción del DNA-reparador y que presenta cierta actividad mutagénica (18,60). Así mismo se comprobó que el cis-diclorodiaminoplatino inhibe selectivamente la síntesis de DNA en las células del tumor ascítico de Ehrlich (65).

Las investigaciones encaminadas a conocer el mecanismo íntimo de la acción del Cisplatino sobre el DNA celular han sido numerosas y realizar una exhaustiva revisión sobre el tema desbordaría el motivo fundamental

de nuestro trabajo; algunas de las publicaciones más reveladoras hacen referencia a tres posibles modelos de interacción: DNA-proteína (DNA-protein crosslink), intracatenaria (intrastrand crosslink) e intercatenaria (interstrand crosslink) (27,85,184) (Fig. 2).

Estudios con nucleótidos y nucleósidos muestran que bases nitrogenadas como la Guanina y la Citosina interaccionan con el Cisplatino con mayor facilidad que otras como la Timina y el Uracilo (128) (Fig. 3)

Después de la unión con las bases se produce una alteración y distorsión de la doble hélice del DNA, lo cual provoca una desnaturalización local de la misma (85).

Rosemberg et al. (135) confirman desde el punto de vista morfológico la interacción del Cisplatino con el DNA cromosómico señalando la aparición de desordenes estructurales en la división de células CHEF-125 (de hámster chino) y AV₃ (de amnios humano).

Se ha sugerido otro mecanismo de acción del Cisplatino basándose en la capacidad de los compuestos de platino para ligarse a la membrana celular. Esta unión estimularía ciertas reacciones inmunes responsables de la especificidad del fármaco por las células-tumorales (40).

La independencia del ciclo celular es, como puede deducirse de lo anteriormente expuesto, un hecho evidente; si bien en algunos tipos celulares se ha observado mayor sensibilidad en la fase G_1 (135).

b) Actividad antitumoral en modelos experimentales

Las propiedades antitumorales de algunos compuestos inorgánicos de Platino fueron descritas por primera vez en el Sarcoma 180 y la Leucemia 1210 del ratón (136). Posteriormente se comprobó que el porcentaje de regresión completa en el Sarcoma 180 del ratón era muy elevada (63%) (137).

La eficacia del Cisplatino se ha comprobado frente

a gran número de tumores experimentales: carcinoma 256, Leucemia ascítica de Dunning (180) y tumores inducidos por el Dimetilbenzantraceno (182) en ratas, melanoma B 16 (128), carcinoma mamario sc CDBF₁ (128), tumor de colon (128), linfoma de Dalton (128) y las leucemias - L1210 y P388 del ratón (158,66). La Tabla I resume la actividad antitumoral del Cis-diclorodiaminoplatino II en el ratón .

La actividad del fármaco objeto de estudio, ha sido valorada por diversos autores (182) frente a otras drogas antitumorales. Los resultados de estos trabajos están resumidos en la Tabla II.

Así mismo se ha empleado el Cisplatino en protocolos de poliquimioterapia especialmente en el tratamiento de la leucemia L 1210 del ratón (tabla III) (146,147).

c) Toxicidad en los animales de experimentación

Los efectos tóxicos más importantes afectan a los

riñones, estómago e intestinos, médula ósea y oído (128).

La toxicidad renal es quizás el efecto tóxico más grave del Cisplatino (75,79,82,118). Así se comprueba que en las ratas tratadas con dosis únicas de 6 mg/Kg de p.v. provocan una necrosis focal de los túbulos renales. La administración de 1 mg/Kg semanalmente durante once semanas dañan al riñón irreversiblemente apareciendo una fibrosis intersticial y glomerular diseminada (39).

Dosis similares a las anteriores hacen disminuir rápidamente los linfocitos circulantes y provocan una atrofia de los órganos linfoides (). Esta acción no se detecta a bajas dosis (128).

La médula ósea de animales tratados sufre una importante hipoplasia si bien los elementos sanguíneos periféricos no están disminuidos en número en los animales tratados (128).

Diversos estudios con animales de experimentación

muestran que se produce una marcada disminución de la audición en los tratamientos prolongados. Dosis de 1,5 mg./Kg administradas a hámsters lesionan el órgano de Corti disminuyendo el número de las células ciliadas externas y ocasionalmente las internas(53). No se han apreciado alteraciones vestibulares en los animales de experimentación (128), pero sí en el hombre (160).

d) Indicaciones terapéuticas

Numerosos autores han demostrado que el Cisplatino posee un efecto antitumoral importante en una amplia variedad de tumores sólidos, tanto en quimioterapia simple como asociado a otras drogas.

Actualmente se utiliza en el tratamiento de los tumores que a continuación se indican obteniéndose un elevado porcentaje de respuestas positivas: cáncer de testículo (teratocarcinomas, seminomas o carcinomas de células embrionarias) (55,118,127,141,150,); tumores ováricos, que responden a tratamientos generalmente múltiples con un índice de remisión clínica completa de

hasta el 31% (23,24,29,55,118,127); cáncer de células escamosas del cuello uterino (156); cáncer recurrente de cabeza y cuello (22,42,74,88); cáncer de pulmón (48) y otros procesos tumorales malignos tales como los osteosarcomas (50), sarcomas (83), carcinomas de parótida (4) y el neuroblastoma de los niños (128).

BLEOMICINA

a) Composición química y mecanismo de acción

Bleomicina es el nombre genérico de un grupo de antibióticos citotóxicos glucopeptídicos azufrados producidos por el "Streptomyces verticillius", que se obtienen mediante sucesivas aplicaciones en resinas de cambio iónico. Fue descubierta por Umezawa et al en 1961 (169) y presenta una importante acción terapéutica en carcinomas escamosos, enfermedad de Hodkin y tumores testiculares (36)

El estudio de la actividad antineoplásica de algunos antibióticos citotóxicos se inició en la década de los 50. Hacman, en 1952 (63) comprobó la eficacia de la Actinomicina C en el carcinoma de Walter y otros tumores experimentales. Posteriormente numerosas investigaciones se desarrollaron con otros antibióticos

antineoplásicos: Sarcomicina (168), Daunamicina (46), Carminomicina (168), Cinerubina (84) y Nogalamicina (182)

Actualmente se conocen más de 200 Bleomicinas diferentes. Su fórmula química presenta un núcleo común y un radical amino terminal $-R$, determinanate de los diversos tipos (168,169,170,171). En la Fig. 4 se representa la fórmula química de algunas Bleomicinas de uso frecuente. El preparado utilizado en la práctica clínica es una mezcla de Bleomicinas A_2 , A_2I , B_1 y B_2 , siendo la Bleomicina A_2 el compuesto más abundante (59).

b) Mecanismo de acción

La Bleomicina inhibe el crecimiento de las bacterias y células mamarias (171).

†
Experiencias realizadas con "E. coli" y células del carcinoma de Ehrlich demuestran que la droga rompe la doble cadena de DNA e inhibe la síntesis de proteínas (161), siendo la rotura del DNA el fenómeno más

importante. La Bleomicina causaría igualmente una disminución del número de figuras mitóticas en las células HeLa por interferir en el proceso mitótico (161).

La rotura de la cadena de DNA se produce en la unión citosina-guanina (10,38,91).

La acción que provoca la escisión de la doble cadena de DNA ocurre en presencia de hierro y oxígeno (73,172), siendo inhibida por compuestos sulfhídricos, ácido ascórbico, peróxido de oxígeno (172) y derivados del etanol (110).

El fármaco reacciona activamente con el ión cúprico formando un compuesto muy estable (163). Esta propiedad permite su difusión en el organismo a través de la sangre y otros fluidos orgánicos. En la célula el complejo Bleomicina-Cu es reducido, transfiriéndose el ión cuproso a una proteína celular. La Bleomicina libre reacciona con una enzima, la Bleomicina-hidrolasa, que desactiva la droga por escisión de las uniones

carboxilamídicas. Existe sin embargo una pequeña cantidad de Bleomicina que no es desactivada siendo responsable de los efectos farmacológicos (162,171).

La concentración tisular de Bleomicina-hidrolasa determina la mayor o menor actividad de la droga; la piel y el pulmón son los órganos que presentan menor cantidad de la citada enzima en el organismo (169). En los animales viejos la actividad enzimática es muy baja (171).

c) Toxicidad en animales de experimentación

La Bleomicina provoca alteraciones pulmonares en gran variedad de animales de experimentación tales como los ratones (16), hámsters (152), ratas (126), cobayas (107), conejos (107), perros (54) y monos (148). Las diferentes vías de administración y los parámetros de toxicidad estudiados por diversos autores están resumidos en la Tabla IV (107).

Las lesiones provocadas por la Bleomicina en pulmón

son similares a las de la intoxicación por oxígeno (1,2,3) y consisten en fibrosis intersticial, infiltrados inflamatorios interalveolares y alveolitis, localizándose principalmente en posición subpleural (16). Estudios ultraestructurales demuestran la existencia de edema celular y signos de necrosis en los pneumocitos I, además de proliferación en los neumocitos tipo II (1,2,3).

Se han cuantificado los cambios histológicos inducidos por la Bleomicina mediante técnicas morfométricas, correlacionándolos con el contenido de hidroxiprolina en el pulmón (153,154). Se comprobó que tras la administración de 20 mg/k y semana la hidroxiprolina aumenta en un 40-50 %. La hidroxiprolina deriva del colágeno tisular y su determinación resulta una excelente referencia para conocer la cantidad de aquella sustancia en el pulmón (43).

La acción de los glucocorticoides reducen la toxicidad pulmonar ante la Bleomicina (164). Otros informes (97) indican un aumento del potencial tóxico

de la droga cuando se asocia en quimioterapia múltiple , así en el ratón la asociación con la Vincristina o el Cisplatino exige un minucioso ajuste de las dosis.

Finalmente, algunos autores (17) señalan alteraciones hepáticas en ratas tratadas con Bleomicina, consistentes en disminución del peso del órgano, aumento del número de hepatocitos binucleados, anormalidades en el cariotipo e incremento del DNA intermediario.

En el hombre se han descrito efectos tóxicos en el pulmón, y la naturaleza de las lesiones es similar a la de los animales de experimentación (20). Krakoff et al. indican además mielosupresión, leucopenia y trombocitopenia, si bien se considera que las Bleomicinas tienen una baja toxicidad hematológica e inmunosupresora (20).

c) Actividad antitumoral en modelos experimentales

El fármaco que nos ocupa es muy activo frente a gran número de tumores transplantables del ratón, tales

como el Tumor ascítico de Ehrlich (20), sarcoma de Rous, tumor mamario espontáneo (78), hepatoma inducido por Tetracloruro de carbono (170) y carcinoma de Lewis (20). Sin embargo los resultados del tratamiento en la Leucemia L 1210 y la P-388 no son satisfactorios. En la rata se ha mostrado activo con el hepatoma ascítico (108,143).

El mecanismo de acción de la Bleomicina en los tumores experimentales no se conoce perfectamente, si bien existen referencias que describen el bloqueo del ciclo celular en la fase G₂, disminuyendo por lo tanto el índice mitótico (113).

d) Indicaciones terapéuticas

La Bleomicina es una droga especialmente indicada en el tratamiento de tumores por su escasa actividad inmunosupresora. Su empleo está indicado en los tumores de origen espinocelular, los linfomas malignos y el cáncer testicular de origen germinal (20).

CARCINOMA DE EHRLICH

En el año 1.905 Ehrlich y Apolant(49) aislaron un adenocarcinoma mamario de ratón que Loewental y Jhan (96) adaptaron a la forma ascítica en 1.932 denominándolo "Tumor de Ehrlich ".Posteriormente se desarrollaron divesas técnicas de cultivo del tumor *in vivo* e *in vitro* comprobándose que se trataba de un excelente modelo de trabajo experimental debido a sus características morfológicas y biopatológicas (47,76).

Morfología

La morfología celular del tumor fué muy discutida en un principio, siendo numerosos los estudios a este respecto (32).Las células parenquimatosas del Tumor de Ehrlich se han clasificado en(30):

-Células de tamaño mediano : Son las células más numerosas, su tamaño es variable ya que se trata de un gupo poco homogéneo. Tienen un núcleo

generalmente excéntrico de cromatina densa con un nucleolo muy evidente. El citoplasma muestra cierta basofilia periférica y puede presentar en algunas células diminutas vacuolas que aumentan de tamaño y número con la edad.

En los cultivos celulares y en la forma ascítica del tumor se observa con frecuencia un tipo celular de células jóvenes con protuberancias digitiformes o yemas. Estas células tienen capacidad mitótica y en ocasiones se dividen por amitosis o endomitosis dando lugar a estirpes celulares tetraploides(32).

No se aprecian diferencias morfológicas entre las células de los cultivos celulares y las células de los tumores in vivo .

- Células de tamaño gigante : Son células poliploides producto de divisiones amitóticas o endomitóticas. Su tamaño supera en ocasiones las 30 micras.

Los núcleos son únicos o múltiples, en número de 3 o 4, ocupando posiciones excéntricas; la cromatina nuclear es laxa. El citoplasma es menos basófilo que el propio de las células anteriores.

Existen células gigantes con evidentes signos de degeneración celular tales como la presencia de vacuolas citoplásmicas o poca definición del núcleo.

- Células vacuoladas : Estas células incluyen aquellas de los tipos precedentes envejecidas y degeneradas.

Su citoplasma está ocupado por una vacuola de gran tamaño que comprime y desplaza al núcleo hacia posiciones periféricas, presentando el aspecto de una célula en sello.

- Células pequeñas picnóticas necróticas : Presentan un citoplasma pequeño, casi inexistente y muy

basófilo. Su núcleo, picnótico, ocupa prácticamente la totalidad de la célula.

El número de estas células es un signo del envejecimiento de la población tumoral ya que son muy numerosas en los últimos estadios.

En la forma sólida las células mantienen la tipología descrita, si bien son de menor tamaño (104).

Cariotipología

Los cromosomas de las células del tumor de Ehrlich han sido estudiados por diversos autores relatándose resultados variables según la estirpe del tumor (47, 67, 130).

La cepa tumoral que mantiene el Instituto Nacional de Oncología presenta 67 cromosomas en el 60 % de las células (30). Otros investigadores observaron cifras similares en la misma cepa, describiendo 63 cromosomas telocéntricos normales y 4 aberrantes (uno

submetacéntrico y tres pequeños fragmentos de tipo M).
(34).

Transmisibilidad del tumor.

El tumor de Ehrlich tiene en general un 100 % de éxito de implantación tanto para lograr formas ascíticas puras, como para las sólidas o mixtas, tras la inoculación de un millón de células neoplásicas (105). Los animales inoculados intraperitonealmente desarrollan el tumor entre los 7 y 14 días muriendo entre los 8 y 28 días postimplante en la forma ascítica (32). En la forma sólida los índices de supervivencia son mayores, oscilando entre los 3 y 4 meses.

Estos resultados están referidos a ratones de raza Suiss ya que se ha comprobado que especies como la *C₃H*, son menos susceptibles para reproducir el tumor (105).

Otras experiencias demuestran que inoculaciones intravenosas de 0,1 ml. de líquido conteniendo 3 millones de células cancerosas producen un 20 % de

muerter en los ratones atribuibles a un cuadro de shock. Inoculaciones de 2 millones de células en la vena caudal producen un 63 % de nódulos tumorales en pulmón, el 48 % de tumores solitarios en corazón y el 74 % de tumores sólidos se presentan en el punto de inoculación.

Al realizar Necropsias seriadas de animales inoculados con un millón de células intraperitonealmente se comprueba la evolución de las lesiones histológicas desde la presencia de algunas células tumorales a los 3-4 días postinoculación, hasta la infiltración tumoral masiva del mesenterio, peritoneo parietal y páncreas el día 14 (32,104). En ocasiones el tumor infiltra otros órganos como el hígado, riñón y bazo (32).

En ratones inoculados subcutáneamente en la región interescapular, además de la masa tumoral en el punto de inoculación, pueden observarse metástasis pulmonares y ganglionares a los 30 días postimplante (105).

MARCADORES TUMORALES

Son sustancias secretadas o acumuladas en los tumores que, demostradas mediante técnicas inmunohistoquímicas, pueden ser empleadas para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad neoplásica (52).

Las sustancias secretadas por los tumores son numerosas, destacando las hormonas y otras proteínas placentarias, inmunoglobulinas, antígenos oncofetales, antígenos de membrana, componentes de los grupos sanguíneos y enzimas (120). El estudio de los marcadores tumorales en las neoplasias mamarias aporta gran número de datos sobre el grado de diferenciación y hormonodependencia de las células cancerosas, así como la identificación de micrometástasis y el tipo de crecimiento neoplásico (invasivo o expansivo) (26).

En este apartado nos proponemos realizar una breve

revisión de los marcadores del cáncer de mama considerados en la actualidad como los más representativos; deteniéndonos especialmente en aquellos que hemos empleado en el caso del Tumor de Ehrlich.

Los marcadores más empleados en el cáncer de mama son:

a) Para las células epiteliales:

a.1. Receptores hormonales (estrogénicos, progesterónicos y testosterónicos) (51,77,81,92,100,103,122).

a.2. Proteínas lácticas tales como la caseína (26,72), el antígeno de membrana epitelial (E.M.A.) (26), la lactoalbúmina (15,26) y la lactoperoxidasa (45).

a.3. C.E.A. (175,176)

a.4. Queratinas (5,6,44,52,120)

b) Para las células mioepiteliales :

- b.1. ATPasa (26)
- b.2. Miosina (120)
- b.3. Actinina (120)

RECEPTORES HORMONALES

La investigación de receptores hormonales esteroideos en los tumores es sistémica en la práctica médica ya que la presencia de los mismos condiciona la eficacia o no de una posible hormonoterapia (103).

Se han propuesto diversos métodos de detección de receptores hormonales esteroideos: bioquímicos, de autoradiografía, histoquímicos e inmunohistoquímicos (99), destacando los bioquímicos e inmunohistoquímicos como más fiables (26).

Los receptores hormonales han sido estudiados

en Oncología Veterinaria aplicándose a tumores mamarios de la perra y la gata (77,94,103,122) obteniéndose en estos animales resultados positivos en un 60 % de los casos, independientemente del tipo histológico del tumor (103). También se han estudiado en los tumores inducidos por el DMBA en la rata (180).

QUERATINAS

Las queratinas son marcadores de los epitelios queratinizados y no queratinizados pudiendo ser empleadas para poner en evidencia tumores de origen epitelial (6). Se ha demostrado que mediante técnicas de fluorescencia o inmunoperoxidasa puede comprobarse la existencia de filamentos de queratina en todos los carcinomas (120), incluso en los menos diferenciados.

Numerosos autores han trabajado con este marcador coincidiendo en que es un elemento de gran ayuda en el diagnóstico preciso de los tumores

anaplásicos y en la detección de micrometástasis especialmente de aquellas localizaciones a nivel de los ganglios linfáticos.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Hemos empleado en nuestro trabajo un total de 100 ratones Suiss, machos, de 3 meses de edad procedentes de los viveros del Departamento de Patología Animal II (Cátedra de Patología General, Médica y de la Nutrición).

Los animales se distribuyeron en lotes y grupos de la manera que a continuación se indica y que resume la Tabla III :

a. Diez animales que se emplearon en la obtención de la forma sólida del tumor original a partir de la forma ascítica del tumor de Ehrlich.

Enoventaanimales utilizados para el implante del tumor en forma sólida, los cuales fueron identificados individualmente mediante marcas en el pabellón auditivo, posteriormente seleccionamos sesenta que fueron los empleados en la

experiencia . Los ratones fueron distribuidos en cuatro lotes de 15 animales cada uno. Estos lotes fueron divididos a su vez en grupos de 5 ratones cada uno y mantenidos en jaulas de plastico modelo Makralon 500 con rejillas metálicas y bebederos automáticos.

Los animales de esta experiencia se mantuvieron en el vivero del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid a una temperatura de 20 a 22 grados C..La alimentación consistió en pienso comercial para ratones y suplemento de pan y lechuga que se administró ad libitum.

TUMOR ASCITICO ORIGINAL

El tumor ascitico original se obtuvo de un ratón Suiss con tumor de Ehrlich cedido por el Instituto Nacional de Oncología .La cepa tumoral procedia del Instituto Gustavo Roussy de Paris y poseía 67 cromosomas de media.

El tumor se mantuvo por inoculación intraperitoneal de un millón de células cada diez días en ratones Suiss

ubicados en la Cátedra de Patología General, Médica y de la Nutrición.

IMPLANTE DE LA FORMA ASCITICA DEL TUMOR .

Una vez sacrificado el animal portador del tumor ascítico se procedió a la recogida de 2 cc de líquido ascítico mediante una jeringa estéril, actuando posteriormente según el protocolo que a continuación se indica:

1. Centrifugado del líquido ascítico a 900 r.p.m. durante 5 minutos

2. Eliminación del sobrenadante, al cual se añade una cantidad equivalente de suero salino fisiológico.

3. Agitación suave hasta formar una suspensión homogénea.

Repetir esta operación (pasos 1, 2 y 3) durante tres veces sucesivas.

4. Finalmente se realiza un recuento del número de células en cámara de Neubauer y se ajusta la

cantidad de suero salino fisiológico hasta conseguir una suspensión que contenga 2 millones de células por centímetro cúbico.

El objetivo de este procedimiento es eliminar otras células no tumorales y restos celulares del líquido ascítico, así como ajustar el número de células por cc. de suspensión.

Posteriormente se procedió a la inoculación subcutánea en la región dorsal de medio cc. de suspensión a cada uno de los 10 ratones destinados a la obtención de la forma sólida del tumor.

TRANSPLANTE DE LA FORMA SOLIDA DEL TUMOR

A los 7 días del implante de la forma tumoral líquida se sacrificaron los animales y se procedió a la extracción por disección de los tumores sólidos.

Sobre los mismos seleccionamos las áreas que no presentaban necrosis o hemorragias y tomamos las muestras oportunas para su estudio histológico y

ultraestructural

Los tumores se trocearon en fragmentos de 1X1X1 mm. que fueron injertados subcutáneamente en la region dorsal de los animales.

ANTIBLASTICOS

Los productos comerciales antitumorales empleados fueron:

- PLATISTIL (CISPLATINO); de Laboratorios Farmitalia
Carlo Erba
- BLEOMICINA (SULFATO DE BLEOMICINA); elaborada por

Laboratorios Almiral

PROTOCOLO DE TRABAJO

El injerto se realizó en 60 ratones Suiss, machos, de 3 meses de edad y un peso medio aproximado de 30 gramos siguiendo las técnicas convencionales ya descritas por otros autores .

La comprobación del prendimiento se efectuó a los 7 y 14 días post-injerto mediante palpación.

Los animales se repartieron según el siguiente esquema:

- LOTE T (Testigo). Formado por 15 ratones a los que se les inyectó intraperitonealmente 0,2 ml de solución salina fisiológica con una periodicidad de 4 días

-LOTE C (Cisplatino). Constituido por 15 ratones a los que se les administró Cisplatino a una dosis de 4 mg/Kg vía intraperitoneal y periódicamente cada 4 días.

-LOTE B (Bleomicina). Formado por 15 animales que recibieron semanalmente una inyección intraperitoneal de Bleomicina a las dosis de 15 unidades / m² de superficie corporal.

- LOTE C+B (Cisplatino + Bleomicina). Con 15 ratones a los que se les suministró conjuntamente

Cisplatino y Bleomicina a las dosis de 2 mg/Kg y 7 unidades/m² de superficie corporal respectivamente.

La duración total del tratamiento fué de 21 días para cada uno de los lotes.

SACRIFICIOS

Los días 21, 28 y 35 de tratamiento fueron sacrificados 5 animales de cada lote elgidos al azar. En el lote C, debido a la muerte de dos animales en el curso de la experiencia, se sacrificaron cuatro ratones al 21avo día y otros cuatro en el día 28.

Todos los sacrificios se realizaron por el método de la dislocación cervical ().

CONTROLES

En el curso de la experiencia se realizaron los siguientes controles diarios, semanales y quincenales :

Diarios :

1. Estado general de los animales comprobándose la vitalidad de los mismos, pérdida de pelo y ulceración de tumores.

2. Supervivencia

Semanales

1. Controlamos el peso de los animales mediante balanza automática Sauter.

2. Realizamos también el control del desarrollo tumoral por medición de los diámetros mayor y menor de los tumores con calibre pie de rey

Quincenales

1. Recuento de globulos rojos y blancos en cámara de Neubauer

2. Fórmula leucocitaria, mediante observación de extensiones de sangre teñidas por el método de May Grumbald - Giemsa.

NECROPSIAS

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se procedió a la realización de la Necropsia completa, ordenada y sistemática de los mismos, así como a la extracción por disección de los diferentes tumores.

TOMA DE MUESTRAS

En la toma de muestras seleccionamos, además de la masa tumoral, diferentes órganos tales como: corazón, hígado, bazo y riñón para observación de posibles metástasis.

Tras el tallado de las piezas realizamos una fijación de las mismas en diversos líquidos según el tipo de estudios que pensábamos realizar:

a. Para Microscopia óptica clásica la fijación se realizó en formol al 4 % durante veinticuatro horas y posteriormente en formol al 10 % a partir de formalina comercial.

b. Las porciones destinadas a estudios histoquímicos fueron sumergidas en líquido de Carnoy durante 5 días

c. El material destinado a estudios Inmunohistoquímicos fué fijado en líquido de Bouin durante cuatro horas , lavandose las piezas posteriormente en alcohol de 40 grados hasta la eliminación total del color amarillo propio de este fijador.

d. Las piezas seleccionadas para la Microscopia Electrónica fueron fijadas en Buffer-Millonig-Glutaraldehído al 2,5% y refijadas con tetróxido de Osmio al 1 %.

INCLUSION

a. Las muestras para Microscopia Óptica fueron incluidas en Paramat por medio de un procesador de tejido automático Shandon-Eliot (modelo Bench SCE 0400)

b. Las piezas para Microscopia Electrónica: Las muestras se incluyeron en Epón Araldita según técnica convencional.

CORTES HISTOLOGICOS

a. Microscopia óptica: Se obtuvieron cortes de un grosor aproximado de cinco micras empleando un microtomo Minnot de la casa Leitz.

b. Microscopia Electrónica : Las muestras se cortaron con un ultramicrotomo LKB III a un espesor aproximado de 400 Å.

TINCIONES

a. Microscopía óptica : Los cortes histológicos se tiñeron mediante las técnicas de Hematoxilina-Eosina, Gallego IV variante, Método de -PAS-Schiff y Carmin de Best.

b. Inmunohistoquímica : Se realizaron inmunotinciones de los tumores mediante las técnicas descritas en la literatura (1) con sueros antiqueratinas (I.F.I.), antitestosterona, anticalcitonina y estradiol (P.A.P.).

c. Microscopía electrónica: Los cortes ultrafinos fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se ha realizado un estudio estadístico de las mediciones tumorales y el número de mitosis por campo de 400 aumentos relacionándolos con el tiempo de tratamiento según el método de regresión lineal

propuesto por CARRASCO DE LA PEÑA (1.982).

A su vez se ha realizado una determinación particularizada de las diferencias entre las medias de los volúmenes tumorales y el número medio de mitosis según la prueba de newman-Keuls (38).

RESULTADOS

ESTADO GENERAL DE LOS ANIMALES, CONTROL DE SUPERVIVENCIA

Hemos observado alteraciones de la vitalidad en los animales del lote Testigo, especialmente en las dos últimas semanas de la experiencia. Estos trastornos consistieron en inmovilidad, dificultad en la marcha y pérdida de peso.

Los animales pertenecientes a los lotes C, B, y C+B no mostraron modificaciones importantes ni del comportamiento ni del estado general. Así mismo, a las dosis terapéuticas empleadas, no hemos podido apreciar clínicamente ninguno de los efectos tóxicos secundarios de los antiblasticos empleados.

Algunos animales presentaron úlceras en la superficie del tumor independientemente del lote al que pertenecieran. La Tabla IV expone el porcentaje de los animales con ulceraciones, en ella puede comprobarse que

la presencia de úlceras es más frecuente en aquellos tumores cuyo crecimiento fué más rápido.

Realizamos también controles de supervivencia en los animales portadores del tumor. A lo largo de la experiencia se han producido dos muertes aisladas en el lote C, debidas, probablemente, a un defecto en la aplicación del antiblástico.

COMPROBACION DEL PRENDIMIENTO DE LOS IMPLANTES TUMORALES

a) Implante de la forma ascítica del tumor de Ehrlich para obtener la forma sólida

Se inocularon un total de 10 ratones, vía subcutánea, en la región dorsal con medio centímetro cúbico de suero salino fisiológico que contenía un millón de células tumorales en dispersión procedentes de un ratón con el tumor de Ehrlich en forma ascítica.

La comprobación del prendimiento tumoral se realizó a los 4 y 7 días de la inoculación, considerando

positivos los casos en que los animales mostraban una tumoración palpable, fluctuante y no caliente.

La Tabla VII muestra el porcentaje de prendimiento tumoral con relación al tiempo transcurrido. Como puede observarse el prendimiento es del 100 % a los 7 días post-injerto, si bien dos de los animales inoculados murieron al segundo día sin que en la Necropsia pudiesemos observar alteración alguna que justificase la muerte de los mismos.

b) Implante de la forma sólida del tumor de Ehrlich.

Inoculamos 100 ratones en la región lumbar, el inóculo procedía de un tumor en forma sólida, perteneciente a uno de los animales del apartado a).

La comprobación del prendimiento se realizó a los 7 y 14 días postinjerto y los criterios utilizados para considerarlo positivo fueron similares a los utilizados en el apartado a).

La tablaVIII expone los resultados obtenidos con relación al tiempo; su estudio muestra que en 8 animales no se produjo el prendimiento de los injertos en ningún momento de nuestra experiencia.

EVOLUCION DEL PESO DE LOS ANIMALES

Se realizaron controles semanales de peso en los diferentes animales, los datos obtenidos en los diferentes grupos establecidos aparecen reflejadas en las tablas IX, X, XI y XII.

La gráfica 1 representa los valores medios del peso de los ratones a lo largo de las semanas que duró la experiencia.

* En todos los lotes existe un incremento del peso de los ratones sensiblemente similar hasta el inicio de los diferentes protocolos de tratamiento.

* Los animales pertenecientes al lote T muestran un

aumento de peso casi lineal hasta la quinta semana, decreciendo ligeramente a continuación y así se mantienen hasta el final de la experiencia.

* En el lote C se producen ligeros aumentos de peso hasta la cuarta semana, decreciendo ligeramente en los últimos días de control.

* Los valores alcanzados por los animales pertenecientes al lote B son inferiores a los del lote T y próximos a los del lote C.

* En los ratones pertenecientes al lote C+B, apreciamos una disminución del peso en la quinta semana, que se mantiene con ligeras variaciones durante el tiempo de tratamiento.

ESTUDIO DE LOS VOLUMENES TUMORALES

Durante el desarrollo del trabajo se han realizado mediciones semanales de los ejes mayor y menor de los tumores.

El cálculo del volumen tumoral se ha realizado de acuerdo con los criterios aplicados en otros modelos experimentales semejantes al nuestro y así, considerando el tumor como un elipsoide de revolución en torno a su semieje mayor (Figura 5), el volumen resulta de la aplicación de la fórmula $V = 4/3 * \pi * a * b * b$, siendo "a" y "b" los radios mayor y menor del elipsoide.

Los volúmenes tumorales están expuestos en las Tablas XV, XVI, XVII y XVIII.

La gráfica 2 representa las medias de los volúmenes con relación al tiempo en los diferentes lotes. La evolución de los lotes T, C, B y C+B es sensiblemente similar durante los veintón primeros días de la experiencia aumentando discretamente durante la primera semana, para producirse un incremento bien notable en el curso de la segunda semana.

Destacamos en el lote T las diferencias volumétricas con respecto a los animales integrados en los C, B y C+B y comprobamos el aumento gradual del

volumen tumoral que llega a ser máximo el día 35 .

En los lotes C y B los valores disminuyen moderadamente durante la primera semana de tratamiento, produciéndose a continuación un descenso progresivo de los mismos . Los valores finales son inferiores a los observados en el inicio del tratamiento.

Los animales correspondientes al Lote C+B muestran un descenso del volumen tumoral en las semanas tercera y quinta de la experiencia. Los volúmenes tumorales alcanzan en este lote los valores más bajos. Consideramos importante señalar la reabsorción total del tumor en dos de los quince animales tratados (13,3 %).

ESTUDIO DEL INDICE DE INHIBICION DEL VOLUMEN TUMORAL

Para realizar un mejor estudio comparativo de los volúmenes tumorales en los diferentes lotes de la experiencia, hemos calculado el índice de inhibición del

volumen tumoral según la fórmula:

$$I.V. = (VmT - VmP) / VmT$$

donde:

VmT= Volumen medio del lote Testigo

VmP= Volumen medio del tumor problema

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XVII. La observación de la misma confirma la disminución progresiva del volumen tumoral. Los lotes C y B alcanzan valores similares al final de la experiencia, si bien en el lote C la regresión tumoral es mayor en la segunda semana de la experiencia. Los tumores de los animales pertenecientes al lote C+B presentan los valores más elevados en las semanas del tratamiento, hecho que coincide con los resultados obtenidos en el estudio del volumen tumoral.

ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO DE LOS TUMORES

Tumor original

MACROSCOPICAMENTE:

El tumor es una masa ovoide de 1,5 X 3,5 cm de diámetros mayor y menor respectivamente. La superficie del mismo es lobulada y está rodeado por una cápsula conjuntiva de color blanco nacarado, la consistencia es media (Fig. 1).

Al corte presenta una imagen abigarrada con áreas de color rosa pálido que alternan con otras marrón oscuro y en ocasiones rojo brillantes.

HISTOLOGICAMENTE:

El tumor es un carcinoma sólido de células cúbicas cuyos tamaños son variables entre las 7 y las 15 micras de diámetro. Los núcleos son amplios, con nucleolos evidentes y cromatina finamente

distribuida (Fig. 2)

Las células tumorales se agrupan de manera general en amplias masas sin estructura definida, si bien en ocasiones forman acinis poco diferenciados. En el seno del tumor se observan algunas hendiduras vasculares.

La zona central del tumor está ocupada por amplias masas necróticas a veces de tipo carioréxico y en ocasiones cariollíticas (Fig. 3)

El índice mitótico es elevado, siendo frecuente observar mitosis heterotípicas (Fig. 4)

Tumores del lote Testigo, primer sacrificio (Grupo T1)

Los animales pertenecientes al grupo T 1 fueron sacrificados a los veintidós días después de realizar la comprobación del prendimiento tumoral.

MACROSCOPICAMENTE:

Los tumores presentan de manera general tamaños variables con una superficie lobulada, rodeada de una cápsula conectiva; a la presión se comprueba una consistencia media. La superficie de corte es rosa pálido y uniforme, si bien en un tumor apreciamos una gran área hemorrágica (Tumor T 1.2)

HISTOLOGICAMENTE

Se conserva la imagen del carcinoma sólido descrita en el tumor original (Fig. 5). Las células tienen un citoplasma basófilo y los núcleos, redondeados u ovoides muestran cromatina en grumos: en ocasiones los citoplasmas se presentan con grandes vacuolas y es relativamente frecuente observar células gigantes multinucleadas. Las mitosis son abundantes y a veces atípicas.

Las áreas de necrosis son menos numerosas que las descritas para el tumor original, apareciendo así mismo hendiduras vasculares y algunas hemorragias de pequeño tamaño (Fig. 6).

Tumores del lote Testigo,segundo sacrificio (Grupo T 2)

Los animales pertenecientes a este grupo recibieron durante catorce días una solución salina fisiológica por vía intraperitoneal según las dosis y pautas ya indicadas (sacrificio a los 28 días)

MACROSCOPICAMENTE:

Los tumores pertenecientes a este grupo aumentaron de manera considerable su volumen, como puede comprobarse en la tabla XM.La consistencia de los mismos es media,la superficie lisa y brillante y se conserva la cápsula conectiva limitante.

Al corte se aprecian amplias áreas de necrosis y hemorrágicas, localizadas fundamentalmente en las zonas centrales.

HISTOLOGICAMENTE:

Las imágenes que observamos son las propias de un carcinoma sólido de células cúbicas

dispuestas en amplias masas; una fina trama conectiva sirve de soporte a las mismas.

Las imágenes de anisocitosis, células gigantes y mitosis homo y heterotípicas son abundantes (Fig. 7, 8 y 9).

Las áreas de necrosis son amplias y numerosas, en su interior pueden observarse en algunos casos depósitos de calcio (Fig. 10).

Tumores del lote Testigo, tercer sacrificio (Grupo T 3)

Los ratones del grupo T 3 recibieron durante 21 días una solución salina fisiológica por vía intraperitoneal y fueron sacrificados a los 35 días de realizar el implante tumoral subcutáneo.

MACROSCOPICAMENTE:

Destaca el elevado valor que alcanza el volumen tumoral en esta fase de la experiencia (Tabla XIII (Fig. 11). La superficie de las neoplasias es blanca, lobulada y brillante; a la sección

se observa una amplia masa necrótica de color marrón y consistencia pastosa. En un caso (T 3.2) la tumoración eliminó gran cantidad de dicha sustancia a través de una úlcera.

HISTOLOGICAMENTE:

La estructura es similar a la descrita para los otros grupos testigos, si bien las áreas necróticas y las imágenes de degeneración celular son más abundantes que en los sacrificios anteriores. (Fig. 12)

Tumores del lote Bleomicina, primer sacrificio (Lote B1)

Los ratones de este grupo fueron tratados con Bleomicina durante un periodo de 7 días. (Sacrificio a los 21 días).

MACROSCOPICAMENTE:

Los tumores presentan un tamaño medio reflejado en la Tabla XIV con una cápsula blanco nacarada que los limita y la consistencia es media .

La superficie del corte es abigarrada y se observa en algunas neoplasias amplias áreas necróticas de color marrón parduzco (B 14 y B13).

HISTOLOGICAMENTE:

Se conserva la imagen de carcinoma sólido. Las células presentan un núcleo de cromatina laxa y forma ovoide, con nucleolo evidente (Fig 13).

La homogeneidad celular es más notable que en los tumores de los lotes T 1 y Tumor original, si bien se reconocen algunas atipias celulares. No hemos podido observar células multinucleadas; las mitosis son por lo general homotípicas. En ocasiones se aprecia la existencia de auténticas hendiduras vasculares que se apoyan casi directamente sobre el parénquima tumoral.

En los tumores con necrosis observables macoscópicamente se presentan témpanos de sales cálcicas.

Tumores del lote Bleomicina, segundo sacrificio (Grupo 82)

Los animales que forman parte de este grupo fueron sometidos a un tratamiento con Bleomicina durante 14 días. (Sacrificio a los 28 días).

MACROSCOPICAMENTE:

El volumen tumoral medio disminuyó considerablemente. Los valores individuales del volumen de los tumores pueden consultarse en la Tabla VII.I

La superficie de corte presenta áreas de necrosis cuyo tamaño es variable, localizadas preferentemente en posición central.

HISTOLOGICAMENTE:

Los tumores son carcinomas sólidos limitados por una cápsula conectiva (Fig. 14) de tejido laxo que emite pequeñas prolongaciones hacia el interior. Se observan zonas muy irrigadas con abundantes hendiduras vasculares.

El estudio citológico revela mayor homogeneidad celular que en los grupos T2 y C2 ,si bien son sonstantes algunas imágenes de anisocitosis (Fig. 13).

Las áreas de necrosis son abundates y ocupan fundamentalmente la zona central de los tumores.

Tumores del Lote Bleomicina,tercer sacrificio (Grupo B3)

Los animales pertenecientes a este grupo fueron sometidos a un tratamiento con Bleomicina consistente en una dosis semanal durante un periodo de tiempo de tres semanas. (Sacrificio a los 25 días).

MACROSCOPICAMENTE:

La morfología de los tumores fué similar a la descrita para el lote B 2, si bien disminuyó el volumen medio tumoral (Tabla XIV).

HISTOLOGICAMENTE:

Los tumores presentan una imagen de carcinoma sólido con algunas áreas adenocarcinomasas. Las células, cuyos núcleos son ovoides, muestran un citoplasma eosinófilo, pequeño y de contornos poligonales.

Consideramos de gran interés señalar que la homogeneidad celular es una de las características más notables en los tumores de este lote.

Las áreas de necrosis son abundantes, si bien de reducido tamaño (Fig. 16).

Tumores del Lote Cisplatino, primer sacrificio (Grupo C1)

Los animales del grupo C 1 fueron tratados con Cisplatino durante un periodo de 7 días según el protocolo anteriormente descrito. (Sacrificio a los 21

dias).

MACROSCOPICAMENTE:

Las neoplasias presentan forma ovoide, están rodeadas por una cápsula conjuntiva en la cual pueden apreciarse algunas hemorragias y la superficie de corte presenta un área central necrótica de color grisáceo (Fig. 17).

HISTOLOGICAMENTE:

Observamos amplias áreas de células tumorales delimitadas por estrechas bandas de tejido conjuntivo. La morfología celular es similar a la descrita para otros lotes, aunque hemos visto mayor número de atipias celulares y un número elevado de células gigantes multinucleadas (Fig. 18).

Las mitosis son por lo general homotípicas.

Los tumores están rodeados por una cápsula conectiva que presenta en ocasiones infiltrados inflamatorios de carácter subagudo

Tumores del Lote Cisplatino, segundo sacrificio (Grupo C2)

Los animales pertenecientes a este grupo fueron tratados con Cisplatino durante un periodo de 14 días. (Sacrificio a los 21 días).

MACROSCOPICAMENTE:

El volumen tumoral queda reseñado en la Tabla XV. Los tumores muestran una cápsula conjuntiva blanco-nacarada, la superficie de los mismos es discretamente lobulada y la consistencia media. Al corte aparece una superficie de color rosáceo sin áreas aparentes de necrosis (Fig. 19).

HISTOLOGICAMENTE:

Las células neoplásicas se agrupan en masas rodeadas por bandas de tejido conectivo; en ocasiones aparecen algunas áreas adenocarcinomatosas.

Los núcleos presentan una notable anisocariosis

observándose en algunos de ellos grandes vacuolas, pícnosis e irregular distribución de la cromatina. Otras veces apreciamos células gigantes multinucleadas (Fig. 20)

Las mitosis son homo y heterotípicas.

Tumores del Lote Cisplatino, tercer sacrificio (Grupo C3)

La pauta de administración del fármaco durante los 21 días de tratamiento ha sido resumida en el apartado de material y métodos. (Sacrificio a los 35 días).

MACROSCÓPICAMENTE:

Destaca el pequeño tamaño de los tumores en comparación con los propios del Grupo T 3 (Tabla XIII). La morfología es similar a la descrita en otros apartados.

HISTOLÓGICAMENTE:

La estructura es la propia de un

carcinoma sólido con escasas áreas necróticas de pequeño tamaño.

Las células tumorales muestran una marcada anisocitosis, y en ocasiones se observan células gigantes (Fig.21)

Tumores del Lote Cisplatino+Bleomicina, primer sacrificio (Grupo C+B 1)

Este grupo está integrado por animales que recibieron dos dosis de Cisplatino y una de Bleomicina, sacrificándose a los mismos el día 21 de la experiencia. (Sacrificio a los 7 días de tratamiento)

MACROSCÓPICAMENTE:

Los volúmenes tumorales pueden leerse en la Tabla XVI. La morfología general de los tumores es similar a la de otros lotes. La forma es ovoide y están rodeados por una cápsula conectiva de color blanco-nacarado.

Al corte se aprecia una imagen abigarrada,

alterndose áreas de parénquima tumoral de color rosa pálido con otras necróticas de tonalidad gris parda (Fig. 22)

HISTOLOGICAMENTE:

Los tumores están constituidos por células de núcleo amplio y ovoide con cromatina en grumos irregularmente distribuida. El citoplasma es acidófilo y en ocasiones estrellado. Se observan algunas células gigantes multinucleadas.

Las áreas de necrosis son abundantes y presentan depósitos de calcio en forma de témpanos. Así mismo son frecuentes las imágenes de anisocariosis y de mitosis homo y heterotípicas (Fig 23).

La cápsula conectiva que rodea al tumor emite trabéculas hacia el interior, en ella se observan numerosos vasos capilares.

Tumores del lote Cisplatino+Bleomicina,segundo sacrificio (Grupo C+B 2)

Los animales pertenecientes a este grupo recibieron Cisplatino y Bleomicina durante 14 días según las pautas ya indicadas. (Sacrificio a los 28 días)

MACROSCOPICAMENTE:

EL tamaño de los tumores se refleja en la Tabla XVI. Las neoplasias presentan una cápsula conectiva que los limita y la superficie de corte muestra áreas rosa pálidas localizadas principalmente en la periferia.

HISTOLOGICAMENTE:

Destaca la homogeneidad celular así como la desaparición casi total de las células gigantes multinucleadas. El número de mitosis disminuyó considerablemente. Las masas tumorales están rodeadas por una cápsula de tejido conectivo laxo que envía prolongaciones hacia el interior, limitando cordones celulares.

Tumores del Lote Cisplatino+Bleomicina, tercer sacrificio (Grupo C+B 3)

Es un grupo integrado por animales que recibieron cinco dosis de Cisplatino y tres de Bleomicina durante veintidós días. (Sacrificio a los 35 días).

MACROSCÓPICAMENTE:

El volumen medio tumoral alcanzó en este grupo los valores mínimos de la experiencia, destacando la remisión total de dos tumores (Tabla XVI). Las neoplasias están bien delimitadas por una amplia cápsula conjuntiva de color sonrosado.

HISTOLÓGICAMENTE:

Los tumores son carcinomas sólidos, apreciándose áreas de tejido conectivo laxo rodeando las masas tumorales. Las células neoplásicas presentan un moderado grado de anisocitosis (Fig. 24)

En el estroma tumoral comprobamos la existencia de

células inflamatorias de carácter subagudo y una notable hiperèmia vascular.

ESTUDIO DEL NUMERO DE MITOSIS

En la Tabla XXIII se expresa la media del número de mitosis por campo microscópico a 400 aumentos en cada uno de los tumores objeto de nuestro estudio. Para calcular dicha media se hicieron diez recuentos del número de mitosis existentes por campo. Igualmente hemos calculado el valor medio del número de mitosis por grupo de animales.

* En el lote T el número de mitosis es siempre más elevado, aumentando durante la primera semana de tratamiento y conservándose prácticamente invariable hasta el final de la experiencia.

* Las mitosis del Lote C no varían en número a lo largo del tratamiento.

* El estudio del número de mitosis en el Lote B demuestra un discreto incremento a lo largo de la experiencia; el número es siempre muy inferior al obtenido para el Lote T.

* En el lote C+B la disminución del número de mitosis es bien evidente en la primera semana de tratamiento, manteniéndose posteriormente hasta el día 35.

ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DEL TUMOR DE EHRlich. MARCADORES TUMORALES.

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico del Tumor de Ehrlich con sueros antiqueratinas, antitestosterona, estrógenos y anticalcitonina no apreciándose diferencias significativas entre los diferentes lotes problemas y testigos, por ello efectuamos una descripción única para cada marcador.

Antiqueratinas: Las células tumorales presentan un citoesqueleto de queratinas que aparece uniformemente teñido alrededor del núcleo y que confiere a la célula una morfología poligonal. Los núcleos celulares no muestran fluorescencia alguna. Así mismo la cápsula tumoral y las trabéculas de tejido conjuntivo fueron negativas a la tinción.

En las células tumorales degeneradas y próximas a las áreas de necrosis se ha observado un aprogressiva disminución de la intensidad en la fluoorescencia.

No hemos comprobado reacción positiva alguna en relación a las técnicas de Peroxidasa-antiperoxidasa empleadas con estradiol, suero anti-testosterona y suero anticalcitonina. Como cortes histológicos testigos hemos empleado tumores de mama de la perra y tiroides de équido.

Estos resultados confirman la naturaleza epitelial del tumor al presentar un citoesqueleto de queratinas y revelan un bajo grado de diferenciación celular.

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL

El estudio ultraestructural realizado sobre los diferentes lotes de animales utilizados en nuestro trabajo, nos ha revelado una serie de datos que los

consideramos significativos para evidenciar los efectos ppositivos que ejercen los fármacos utilizados sobre el Tumor Sólido de Ehrlich transplantedo a ratones Suiss. Aunque también debemos resaltar que la Microscopia Electrónica no muestra diferencias claras entre la morfología del tumor en animales testigos y cada uno de los Lotes tratados.

Es decir, hay diferencias morfológicas del tumor entre testigos y tratados pero no podemos afirmar por este estudio que el Cisplatino, la Bleomicina o la combinación de ambos muestren separadamente diferencias de respuesta a nivel celular en relación con el lote Testigo.

Lote Testigo:

Las células tumorales de los animales testigos muestran un gran pleomorfismo celular, presentan núcleos grandes junto a otros pequeños pero siempre son muy hipercrómicos y con presencia de irregularidades a nivel de la carioteca (escotaduras o protusiones, Fig.27).

Los nucleolos, de las células que no están en división, son grandes y generalmente múltiples.

Las organelas intracitoplasmáticas son escasas.

Las mitosis son frecuentes y heterotípicas con imágenes de fragmentación irregular de cromosomas y en ocasiones observamos imágenes que podrían interpretarse como amitosis (Fig.26).

Resulta especialmente importante que en gran número de campos estudiados existe una falta casi absoluta de cohesión celular, y así los elementos anaplásicos aparecen casi independientes unos de otros.

Lotes Cisplatino, Bleomicina y Cisplatino+Bleomicina
(animales tratados).

En este grupo de animales tratados, las imágenes ultraestructurales observadas son en cierta medida semejantes, aunque difieren claramente de las descritas

en el caso de los animales testigos.

A pequeños aumentos, observamos que el pleomorfismo celular existe pero es discreto (Figs 29, 30). Los núcleos son grandes o pequeños pero en su interior se visualiza abundante eucromatina y los grumos heterocromáticos sólo aparecen en las zonas próximas al nucleolo o distribuidos de una manera prácticamente normal en cuanto a la localización y cantidad.

Existen células con nucleolos únicos y de tamaño normal. La hiperplasia de esta organela no es frecuente en los animales tratados.

Los citoplasmas celulares muestran a veces vacuolas lipídicas, aumento del número de lisosomas y mitocondrias degeneradas.

Hemos observado en algunos campos cierta reacción inflamatoria de células linfocitarias y polimorfonucleares que rodean las células tumorales.

Finalmente queremos reseñar que en todos los Lotes tratados hay una cohesión celular evidente, las células tumorales aparecen en masas, están muy próximas unas de otras aunque no hemos podido localizar ninguno de los tipos clásicos de unión intercelular.

DETERMINACIONES HEMATOLOGICAS

Hemos realizado una muestra de sangre los días 0, 14 y 28 en dos animales de cada grupo elegidos al azar.

a) Recuento de hematíes

Los valores medios de los resultados obtenidos en el recuento de globulos rojos están resumidos en la Tabla XVIII

El análisis de dichos resultados nos permite comprobar que:

* En los lotes Testigo y Cisplatino se produce una disminución del número de hematíes a medida que avanza

la experiencia.

* Los lotes tratados con Bleomicina y Cisplatino+Bleomicina presentaban una disminución discreta del número de hematíes en la segunda toma.

b) Recuento de leucocitos

El número de leucocitos por milímetro cúbico en los diferentes lotes está expresado en la Tabla XIII

En los Lotes Testigo y Cisplatino se puede apreciar un descenso del número de leucocitos, especialmente marcado durante los primeros catorce días y una tendencia a la recuperación de los valores iniciales.

En el Lote Cisplatino+Bleomicina la leucopenia es menos evidente, si bien los valores medios disminuyen progresivamente.

En los animales pertenecientes al Lote Cisplatino+Bleomicina el número de globulos blancos

aumenta durante las dos primeras semanas .

b) Fórmulas leucocitarias

La Tabla XIX resume los resultados del estudio de la fórmula leucocitaria para cada uno de los lotes. No hemos observado diferencias notables entre los diferentes grupos en el tiempo de la experiencia.

ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS VOLUMENES TUMORALES.

El método estadístico empleado tiene por objeto establecer la ecuación de la recta que liga el volumen tumoral con el tiempo de tratamiento (expresado en días). A su vez se realiza un estudio comparativo del volumen tumoral alcanzado al final de la experiencia entre los diferentes lotes de animales sometidos a tratamiento y testigos.

Para simplificar la lectura de este capítulo señalaremos los resultados obtenidos expresando la ecuación de regresión y la conclusión que se obtiene de su análisis. Los datos referentes a cada uno de los grupos están expresados en las tablas XX, XXI

a) Ecuaciones de regresión

Las ecuaciones de regresión obtenidas son:

Para el Lote T:

$$y = 0.99 X + 4.57$$

donde y = volumen tumoral

X = tiempo de tratamiento

como puede comprobarse en la tabla el valor F experimental es superior al F teórico.

Conclusión: La pendiente de la recta es significativamente mayor que cero. El volumen tumoral aumenta con el paso del tiempo.

Para el Lote B:

La ecuación de regresión es:

$$y = -0.073 X + 3.44$$

El valor experimental de F es mayor que el F teórico.

Conclusión: La pendiente es significativamente menor que cero. El volumen tumoral disminuye con el paso del tiempo.

Para el Lote C:

La ecuación de regresión es:

$$y = -0.16 X + 4.23$$

El valor de F experimental es superior al de F teórico.

Conclusión: La pendiente de la recta es significativamente distinta de cero. El volumen tumoral disminuye con el paso del tiempo.

Para el Lote C+B:

El valor de F experimental es mayor que el de F teórico.

Conclusión: La pendiente es significativamente distinta de cero. El volumen tumoral disminuye con el paso del tiempo.

b) comparación de los volúmenes tumorales

Conclusión: La observación de la tabla demuestra que existen diferencias significativas entre los lotes tratados y testigo. Igualmente existen diferencias significativas entre los lotes tratados con quimioterapia simple y múltiple. Las diferencias de

volúmenes entre los lotes C y B no son estadísticamente significativas.

ESTUDIO ESTADISTICO DEL NUMERO DE MITOSIS

El método estadístico empleado tiene por objetivo establecer la ecuación de la recta de regresión que liga el número de mitosis con el tiempo de tratamiento (expresado en días)

La presentación de los resultados se realiza siguiendo el esquema del apartado anterior. Las tablas que resumen los diferentes parámetros estadísticos se corresponden con los números:

a) Ecuaciones de regresión:

Las ecuaciones de regresión obtenidas son:

Para el Lote T:

$$y = 0.31 X + 6.48$$

donde y = número de mitosis

x = tiempo de tratamiento

como se observa en la tabla el valor de F experimental es mayor que el valor de F teórico.

Conclusión: La pendiente de la recta es significativamente mayor que cero. El número de mitosis aumenta con el paso del tiempo.

Para el Lote B:

La ecuación de regresión lineal es :

$$y = - 0.36 X + 6.91$$

El valor de F experimental es mayor que el valor de F teórico.

Conclusión: La pendiente de la recta no es significativamente diferente de cero. El número de mitosis no se modifica con el tiempo.

Para el lote C:

$$y = 0.18 X + 7.17$$

El valor de F experimental es menor que el de F teórico.

Conclusión : La pendiente de la recta no es significativamente diferente de cero. El número de mitosis no se modifica con el tiempo.

Para el lote C+B:

$$y = - 0.37 X + 9.97$$

El valor de F experimental es superior al valor de F teórico.

Conclusión : La pendiente es significativamente diferente de cero. El número de mitosis disminuye con el tiempo.

b). Comparación del número de mitosis (día 35)

Como se deduce del estudio de la tabla no existen diferencias significativas entre el número de mitosis de los lotes C, E, y C+B. El lote T difiere significativamente con los otros lotes sometidos a tratamiento.

Conclusión: El número de mitosis en el lote testigo es superior al de los otros lotes tratados.

DISCUSION

El trabajo realizado tiene por objeto estudiar la evolución de la enfermedad cancerosa en ratones Suiss injertados con Tumor sólido de Ehrlich y sometidos a la acción de Cisplatino y Bleomicina en terapia simple y combinada. En el presente capítulo analizaremos los diversos aspectos que hemos estudiado, comparando nuestros resultados con los descritos por los diferentes autores consultados, habida cuenta de la escasez de datos que muestra la bibliografía a este respecto.

Supervivencia

Consideramos que la supervivencia observada en nuestra experiencia es buena y coincidente con las observaciones de otros autores (105) para los carcinomas sólidos de Ehrlich. Las dos muertes producidas el día 21 en el lote Cse debieron a un defecto en la aplicación intraperitoneal del antitumoral que provocó una

importante hemorragia interna en ambos casos.

Estado de los animales

En general, podemos indicar que los animales pertenecientes a los grupos C, B y C+B no presentaron modificaciones de su estado atribuibles al tumor o a la toxicidad de las drogas. Otros autores señalan en sus trabajos con tumores experimentales resultados similares cuando emplean el Cisplatino y la Bleomicina en régimen de monoquimioterapia (20,66,78,112,128, 136,137,146,147,158, 170,180 182,), la asociación de ambas drogas debería provocar menores efectos secundarios ya que las dosis individuales de cada fármaco son menores.

En los animales del lote Testigo la interacción huesped-tumor es aceptable durante los primeros días de la experiencia, produciéndose posteriormente una importante pérdida de depósitos grasos y en ocasiones amiotrofia de las masas musculares.

El cuadro, acompañado de los demás síntomas ya indicados en el capítulo de resultados, es el propio de una enfermedad neoplásica avanzada y coincide con el descrito en otros tumores experimentales (8,12,30,58,59 60).

Metástasis

No hemos comprobado la existencia de metástasis ganglionares ni viscerales en ninguno de los lotes de nuestro estudio. Algunos autores (105) han descrito la existencia de metástasis pulmonares en ratones implantados con carcinoma sólido de Ehrlich; si bien queremos indicar que el punto de injerto tumoral se situaba en la región interescapular, mientras que nosotros lo hacíamos en la región lumbar, área que por su anatomía dificulta notablemente la difusión de las células cancerosas.

Por otro lado existen métodos específicos para provocar experimentalmente metástasis, inoculando un número de células muy elevado provocan menor número de

metástasis de las que teóricamente podríamos esperar (104).

Por todo ello suponemos que el huesed es capaz de desarrollar un sistema de defensa (natural o inmunitario) que elimine un pequeño volumen de células liberadas a la circulación general desde el tumor original.

Volumenes tumorales

En los animales pertenecientes al lote Testigo el incremento del volumen tumoral se produce de acuerdo con los datos recogidos para otros tumores sólidos transplantables (8,12,147). Se considera que tras el inóculo existe una fase de latencia, que en nuestro caso fué de 14 días aproximadamente, en la cual el crecimiento es mínimo; inmediatamente después el volumen tumoral aumenta siguiendo un patrón exponencial, hasta alcanzar un periodo de estabilidad o equilibrio.

En el lote T el aumento del volumen tumoral es

progresivo a lo largo de toda la experiencia ,mostrando importantes diferencias con respecto al volumen de los lotes tratados en terapia simple o múltiple. Los resultados del tratamiento simple son similares a los descritos para otros fármacos (128). La quimioterapia múltiple presenta un efecto sinérgico no descrito hasta el momento en modelos experimentales.

Estudio anatomopatológico

Los estudios que sobre morfología de las células tumorales del carcinoma de Ehrlic en forma ascítica se han realizado han sido numerosos (30,49); la mayoría de ellos han descrito células procedentes de tumores ascíticos o de cultivos celulares y estaban encaminadas a estudiar los diversos tipos celulares y su evolución a lo largo del tiempo.

Sin embargo es de destacar el escaso número de referencias bibliográficas que existen en la literatura sobre la forma sólida, bien entendido que se trata de un

modelo experimental muy empleado para protocolos de quimioterapia debido a la facilidad que ofrecen para cuantificar los efectos de la droga sobre el tumor. Algunos autores (105) indican que se trata de un carcinoma sólido de células indiferenciadas que en ocasiones puede presentar imágenes muy evidentes de anisocitosis y anisocariosis constituyendo un verdadero carcinoma anaplásico. Nuestras observaciones coinciden en lo fundamental con la anterior descripción.

A partir de nuestro modelo de trabajo y de aquellas descripciones morfológicas que han realizado otros investigadores sobre tumores experimentales, proponemos a continuación un modelo de estructura del Carcinoma sólido de Ehrlich transplantado subcutáneamente al ratón.

Macroscópicamente, hemos considerado al tumor como un elipsoide de revolución en torno a su semieje mayor (8), cuya superficie está limitada por una cápsula conectiva de naturaleza generalmente laxa; acompañando a la misma penetrarían los vasos nutricios de la

tumoración habitualmente escasos en número, de pequeño calibre y que profundizan muy poco en el parénquima neoplásico. La cápsula emite finas trabéculas que limitan incompletamente masas de tumor.

Inmediatamente debajo de la cápsula aparece una capa de parénquima cuyo espesor es variable según la fase de crecimiento del tumor. Dicha capa es de consistencia firme y coloración sonrosada o blanquecina, pudiendo presentar a la sección puntos hemorrágicos rojo-brillantes.

El centro de la tumoración está ocupado por una zona de necrosis que presenta consistencia pastosa y color marrón sucio o gris.

En ocasiones puede observarse una línea de transición entre la capa de tejido parenquimatoso y la zona de necrosis, donde se aprecia una coloración variable de tonalidad mate. Esta capa no suele aparecer en la totalidad del tumor y su grosor es, por lo general pequeño.

Microscópicamente, se confirma la estructura anteriormente descrita.

La capa de tejido parenquimatoso está constituida por una población celular de morfología variada y disposición concéntrica que describiremos modificando otras clasificaciones realizadas en la forma ascítica del tumor (Carda, Moore, Di paolo, Hull):

*ESTRATO DE CELULAS DE TAMAÑO MEDIANO. Este grupo celular está situado en la periferia del tumor, limitando con la cápsula tumoral y se compone de células cúbicas, de citoplasma discretamente basófilo y núcleo redondo, amplio y excéntrico con cromatina en grumos y uno o dos nucleolos bien evidentes. El tamaño celular oscilaría entre las 7 y 10 micras de diámetro.

La capa de células de tamaño medio es la más activa del tumor, siendo frecuente observar divisiones celulares por mitosis (típicas o atípicas), amitosis y endomitosis, lo que produce un número variable de

células hiperplóides de núcleos gigantes o multinucleadas (células gigantes).

Las células medias serían las más numerosas en los estadios jóvenes del tumor y debido a su gran actividad las más adecuadas para realizar implantes

La trama conectiva tumoral es escasa, limitándose a algunas trabéculas que en ocasiones muestran pequeños focos inflamatorios subagudos. Los vasos que nutren al tumor acompañan a las trabéculas y emiten una red capilar (hendiduras capilares) sobre la que descansan las células neoplásicas.

* CAPA DE CELULAS VACUOLADAS. Constituida por células que en nuestra opinión derivan de las anteriormente descritas. Su morfología celular varía desde una célula cúbica con algunas vacuolas de pequeño tamaño en su interior hasta células con numerosas vacuolas citoplasmicas y nucleares de tamaño heterogeneo. El núcleo presenta la cromatina en grumos densos.

En los tumores sólidos que hemos estudiado no hemos observado las llamadas "células en anillo de sello" descritas por otros autores en la forma ascítica.

La trama conectiva no existe en el estrato de células vacuoladas y tampoco pueden observarse hendiduras vasculares.

En el "estrato de transición" pueden observarse células en diferentes estadios de necrosis.

El modelo de estructura que presentamos ha sido observado en los tumores de nuestra experiencia. En los animales sometidos a tratamiento pudimos comprobar que el estrato de células de tamaño medio era comparativamente mayor que el de los tumores Testigos, junto a una mayor uniformidad de las células. Estos hechos los explicamos teniendo en cuenta que el tratamiento quimioterápico destruye más fácilmente aquellas células de menor diferenciación, con equipos enzimáticos débiles y con ciclos metabólicos deficientes (69).

Mitosis

Basandonos en el modelo anteriormente propuesto consideramos de gran importancia señalar que para obtener resultados fiables en los recuentos del número de mitosis los estudios deben realizarse en el estrato de células medianas.

Nuestras observaciones sobre el efecto de la Bleomicina en la actividad mitótica celular están en desacuerdo con las de otros autores (112), que describen una disminución del número de mitosis en el Tumor Ascítico de Ehrlich. Sus resultados son coincidentes con los nuestros en otros aspectos tales como que el efecto de la droga se produce después de un largo periodo de actuación de la misma.

El Cisplatino no tiene acción antimitótica directa (135). Nosotros hemos comprobado que el número de células en mitosis no disminuye con el tiempo de tratamiento.

La acción combinada de Cisplatino+Bleomicina sobre el índice mitótico no ha sido referida hasta el momento; a partir de nuestros estudios se deduce que ambos fármacos provocan un efecto sinérgico inhibitor de las mitosis en el Tumor de Ehrlich. En nuestra opinión la disminución del número de mitosis no se debe a la acción directa de la combinación quimioterápica sobre la fase de mitosis en el ciclo celular, sino más bien a que dicha combinación actúa en la interfase impidiendo ciertos mecanismos metabólicos de las células. Nuestro estudio ultraestructural confirma lo anteriormente expuesto ya que hemos comprobado que los tumores sometidos a tratamiento tienen una morfología celular propia de la interfase (abundante eucromatina, núcleolos evidentes, citoplasmas amplios con organelas bien desarrolladas, etc), mientras que en los tumores Testigos existe mayor tendencia hacia la fase de mitosis.

Estudio ultraestructural

La discusión ultraestructural sobre la acción de

los diversos fármacos empleados en las células tumorales presenta la dificultad de la escasez de citas bibliográficas sobre el tema.

1.2.3.3. El núcleo

El núcleo de las células en todos los tumores tratados muestran nucleolos bien evidentes en los inicios de la experiencia para, posteriormente, perder progresivamente la definición llegando en algunos casos a desaparecer completamente. Este hecho se interpreta como una pérdida de la capacidad de proliferación celular (102,129).

En los lotes tratados con antitumorales parece ser que la lucha antitumoral también se produce aumentando el número de lisosomas celulares, aunque el aumento del número y tamaño de los mismos es menos evidente en nuestro trabajo que el indicado en otros protocolos de quimioterapia (56).

Finalmente podemos afirmar que la Bleomicina, el Cisplatino o la mezcla de ambos actúan posiblemente a nivel de la membrana celular, siendo destacables las

diferencias entre la cohesión evidente de las células tumorales en los animales tratados y la falta de cohesión en las células de los animales testigos(37).

Actividad antitumoral del Cisplatino en el Carcinoma Sólido de Ehrlich

En nuestra experiencia hemos comprobado que el Cisplatino ha sido bien tolerado a las dosis empleadas y no aparecieron signos importantes de toxicidad, hecho confirmado por otros autores (128,136,137,160,162).

Los resultados descritos en el presente trabajo demuestran un importante efecto antitumoral del Cisplatino en el Tumor Sólido de Ehrlich, con regresión parcial del volumen tumoral en todos los animales tratados. Estos resultados coinciden con los indicados por otros autores, que consideran el Cisplatino un prooducto antitumoral muy activo, en diversos modelos de neoplasias sólidas transplantables del ratón, tales como el carcinoma mamario CD₀F₁, o el tumor 38 de colon (163).

La valoración gráfica de la inhibición del crecimiento tumoral nos permite comprobar cómo la actividad antineoplásica se desarrolla progresivamente durante el transcurso de la experiencia, hecho que no coincide con las afirmaciones de algunos autores (137) que señalan una regresión tumoral especialmente marcada en las fases finales de experiencias con el Sarcoma 180 del ratón.

El estudio histológico y ultraestructural de los tumores tratados con Cisplatino nos muestra un grado de anisocitosis moderado que contrasta notablemente con el observado en los Tumores Testigo; así mismo comprobamos la existencia de algunos infiltrados inflamatorios subagudos y de mitosis sin graves alteraciones cromosómicas, junto a endomitosis y amitosis. Todo ello nos permite confirmar que la actividad del fármaco se produce en periodo de interfase y que afecta principalmente a las células con un equipo metabólico débil o deteriorado (70). La existencia de infiltrados inflamatorios en escasa cantidad confirmaría la teoría

que explica la actividad antitumoral del Cisplatino como resultado de la estimulación de ciertos mecanismos inmunes del hospedador contra el tumor (40). En nuestra opinión este efecto es complementario al bloqueo de la síntesis de DNA ya descrita en la introducción (18,27,60,65,85,184), pero no justifica por sí sólo el alto grado de inhibición del crecimiento tumoral.

Actividad antitumoral de la Bleomicina en el carcinoma sólido de Ehrlich.

La actividad antitumoral de la Bleomicina ha sido similar a la observada para el Cisplatino en lo referente a la disminución del volumen tumoral. La administración de Bleomicina produjo remisiones parciales en todos los animales tratados.

Queremos resaltar en este apartado la mayor uniformidad celular que pudimos comprobar frente al lote de tumores tratados con Cisplatino; además de una progresiva desaparición de las células gigantes y las endomitosis en la segunda y tercera semana de



tratamiento.

La observación ultraestructural de las mitosis no revela la existencia de cromosomas espinosos o fragmentados como ha sido descrito por algunos autores (46) en carcinomas de Ehrlich tratados con un antiblástico similar.

Actividad antitumoral de la combinación Cisplatino + Bleomicina sobre el carcinoma sólido de Ehrlich.

La respuesta al tratamiento múltiple ha sido mayor que la obtenida con la quimioterapia simple, a pesar de ser menores las dosis administradas. La respuesta parcial al tratamiento ha sido del 100%, observándose un 60% de remisiones totales al final de la experiencia; es de destacar que a los 14 días de tratamiento se comprobó la remisión total en uno de los animales tratados (10%), junto a una notable disminución del volumen medio tumoral.

Por todo ello, la asociación de Bleomicina y Cisplatino debe considerarse una combinación antineoplásica muy eficaz para el tumor de Ehrlich, ya que a un elevado porcentaje de respuestas se asocia la rapidez con que se presentan los resultados sin efectos tóxicos secundarios.

CONCLUSIONES

1. Los ratones Suiss injertados con tumor de Ehrlich y sometidos a protocolos de quimioterapia simple y múltiple con Cisplatino y Bleomicina mostraron un índice de supervivencia elevado. Los protocolos de quimioterapia simple y múltiple no presentaron efectos clínicos secundarios en ninguno de los lotes sometidos a tratamiento.
2. El patrón de crecimiento tumoral es el de un elipsoide de revolución en torno a sus semiejes. Se ha comprobado la existencia de diversos estratos celulares que se corresponden con diferentes grados de actividad celular, las células más activas se encuentran en la periferia del tumor, mientras que la parte más interna está ocupada por restos celulares en distintas fases de necrobiosis.
3. Los volúmenes tumorales de los animales tratados con

Cisplatino y Bleomicina en régimen de terapia simple no sufren variaciones estadísticamente significativas a lo largo del tiempo de tratamiento. Su tamaño difiere notablemente del observado para los tumores del lote Testigo.

4. La combinación de Cisplatino y Bleomicina a las dosis y pautas de administración indicadas hace disminuir significativamente el volumen tumoral durante el tratamiento; el estudio comparativo de los volúmenes tumorales del lote Cispatino+Bleomicina con los demás lotes revela la efectividad de la combinación al alcanzar los valores más bajos a lo largo de la experiencia.

5. Histológicamente apreciamos mayor uniformidad celular en los tumores sometidos a tratamiento, destacando la acción que en este sentido desarrolla la Bleomicina.

6. Las células tumorales son de estirpe epitelial, como lo demuestra la existencia de un citoesqueleto de queratinas, y presentan un elevado grado de

indiferenciación que ha sido comprobado mediante el estudio de marcadores para los receptores estrógenicos, testosterona y calcitonina.

7. La Microscopia Electrónica revela diferencias notables entre los tumores tratados y los testigos, consistentes en una mayor disposición de los testigos para la división celular; mientras que los tratados muestran la morfología propia de la interfase.

8. El estudio del número de mitosis muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sometidos a tratamiento y los testigos.

9. La combinación de Cisplatino y Bleomicina disminuye considerablemente el número de mitosis en los tumores. Dicha disminución se debe a la acción de los fármacos sobre el metabolismo celular y no debe atribuirse a un mecanismo antimitótico de los mismos.

RESUMEN

En el presente trabajo hemos realizado un estudio biológico y anatomopatológico de ratones Suiss injertados con Tumor sólido de Ehrlich y sometidos a un régimen de quimioterapia simple y múltiple con Bleomicina, Cisplatino y Cisplatino+Bleomicina. Los resultados más destacables han sido la remisión tumoral, la homogeneidad celular, la disminución del índice mitótico y el menor número de mitosis atípicas observables en los animales tratados. Así mismo queremos destacar la baja toxicidad de los fármacos a las dosis empleadas. De manera general pudimos comprobar anemia y leucopenia en todos los animales de la experiencia. El protocolo poliquimioterápico se revela de mayor eficacia que la quimioterapia simple a pesar de las menores dosis empleadas.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAMSON, I.Y.R.; BOWDEN, D.H.; WYANTT J.P..(1.970). "Oxygen poisoning in mice: ultraestructural and surfactant studies during exposure and recovery". Arch. Pathol. 90:463-472 (1.970)
2. ADAMSON, I.Y.R.; BOWDEN, D.H..(1.977). "Origin of ciliated alveolar epithelial cells in bleomycin induced lungs injury". Am. J. Pathol. 87: 569-576
3. ADAMSON, I.Y.R.; BOWDEN, D.H..(1.979) "Bleomycin-induced injury and metaplasia of alveolar Type 2 cells". Am. J. Pathol. 96:531-544
4. ALBERTS, D.S.; MANNING M. R.; COUTTHARD, S.W..(1981) KOOPMANN C.F.; HERMAN, T.S.: "Adriamycin, Cisplatinum, Ciclophosphamide combination chemotherapy for advanced carcinoma of the parotid gland." Cancer 47:645-648

5<.ALTMANNBERGER, M.; OSBORN, M.;SCHANER, A.;WEBER, K..
(1.981)."Antibodies to different Intermeediate Filament
Proteins Cell Type-Specific Markers on Parafin-Embeeded
Human Tissues. Lab. Inv.4:427-434

6. ALTMANNBERGER, M.; WEBER, K; HOLSCHER, A.; SCHANER
A.; OSBORN, M..(1.982)."Antibodies to Intermediate
Filaments as Diagnostic Tools Human Gastrointestinal
Carcinomas Express Prekeratin". Lab. invest.
46(5):520-526

7. AMER, M.H.; IZBICKI, R.M.; VAITKEVICIUS, V.K.; AL-SA-
RRAF, M..(1.980)."Combination chemotherapy with
Cisdiaminedichloroplatinum, Oncovin and Bleomycin (COB)
in advanced head and neck cancer." Cancer 45:217-223

8. ARRAIZA-GOICOECHEA, A..(1.976) "Sarcoma 180: "Estudio
biológico y anatomopatológico, y sus modificaciones bajo
la acción del Prospidin, Vincristina y 5-Fluoracilo.
Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza.

9. ARROYO, J.J.; MURCIA, R.C..(1.964). "Análisis

citológico de un tumor ascítico hiperploide de ratón".
Genet. Iber. 16: 59-67

10. ASAKURA, H.; UMEZAWA, H..(1.978). "DNA structures
required for Bleomycin binding". J. Antibiot. 31:156-158

11. ASO, Y.; YONEDA, K.; KIKAWA, Y..(1.976).
"Morphologic and biochemical study of pulmonary changes
induced by Bleomycin in mice". Lab. Invest. 35:558-568

12. BAGSHAW, K.D..(1.968). "Tumour Growth and
antimitotic action". Br. J. Cancer 22:698-710

13. BAHADUR, A..(1.986). "Chemotherapeutical studies on
Dalton's lymphoma with Cisplatin." Pol. J. Pharmacol
Pharm. 37(4):463-468

14. BAHADUR, A..(1.986). "Induction of cell mediated
immunity in vitro and in vivo after
Cisplatin-treatment". Pol. J. Pharmacol. Pharm.
37(4):463-468

15. BAHU, R.M.; MANGKORNKANOK, M.M.; ALTBERTSON, D.; FORS, E.; MOLTENI, A.; BATTIFORA, H..(1.980). "Detection of alpha-lactoalbumin in breast lesions and relationship to estrogen receptors and serum prolactin." Cancer 46:1.775-1.780

16. BAKER, J.; SCHAEPI, U..(1.971). "Interstitial pneumonia and fibrosis in Swiss mice injected twice week with altogether 30 doses of Bleomycin." Research report from Mason Research Institute, Worcester, M.A. to Laboratory of Toxicology, NCL contract NIH-70-2055, submitted 5/7/71. Citado por Muggia, 1.983.

17. BARNI, S.G.; BERNOCCHI, G.; SCHERINI, E.; MARES, V..(1.983). "Growth and polyploidization of the liver of early postnatal rats treated with Bleomycin." Cell. Biol. Int. Rep. 45: 332-340

18. BECK, D.J.; BRUBAKER, R.R..(1.975) "Mutagenic properties of Cisplatinum II diamminochloride in "Escherichia Coli." Mutat. Res. 27:181-189

19. BERKOW, R.. (1.981). "Merck Manual". 13 ed. Rahway, N.J. Merck&Co. 1890-1898.

20. BLUM, R.H.; CARTER, S.K.; AGRE, K. (1.973) "A Clinical Review of Bleomycin, a new antineoplastic agent. Cancer 31(4):903-914

21. BRINLEY, B.T.; CHANG J.P.. (1.975) "Mitosis in tumors cells: methods for light and electron microscopy." Methods in Cancer Research. Ed. Academic Press. London. XI:274-273

22. BROWN, A.W.; BLOM, J.; BUTLER, W.M.; GARCIA-GUERRERO, G.; RICHARDSON M.F.; HENDERSON, R.L.. (1.980). "Combination chemotherapy with Vimblastine, Bleomycin and Cis-diamminedichloroplatinum (II) in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 45:2830-2835

23. BRUCNER, H.W.; COHEN, C.J.; WALLACH, R. C.. (1.978) "Treatment of advanced ovarian carcinoma with Cis-dichlorodiammineplatinum (II): Poor-risk patients

with intensive prior therapy. Cancer Treat. Rep.: 62: 555-558.

24. BRUCNER, H.W.; COHEN, C.J.; GOLDBERG, J.D.; KABAKOW, B.; WALLACH, R.; DEPPE, G.; GREENSPAN, E.M.; GUSBERG, S.B.; HOLLAND J..(1.981) "Improved chemotherapy for ovarian cancer with cis-diamminedichloroplatinum and Adriamycin.Cancer 47: 2228-2294

25. BRUCKLAND, M.D.; HALL, L.; MOWLEN, A.;WHATLEY, B.F..(1.981)"A Guide to Laboratory Animal Technology".Ed. William Heinemann Medical.

26. BUSSOLATI, G.; PICH, A.; ALFANI, V..(1.975). "Immunofluorescence detection of casein in human mammary dysplastic and neoplastic tissues. Virchows Arch. A. Pathol. and Histol. 365: 15-21

27. BUTOUR, J.L.; MAZARD, A.M.; MACQUET J.P..(1.985). "Kinetics of reaction of cisplatinum compounds with DNA in vitro."Biochem. Biophys. Res. Commun. 133(1): 347-353

28. BRAZHNIKOVA, M.G..(1.974). "Physical and chemical characteristics and structure of carminomycin, a new antitumor antibiotic." J. Antibiot. 27: 254-259

29. CAIN, J.M.; SAIGO, P.E.; PIERCE V.K.; CLARK, D.K.; JONES, W.B.; SMITH, D.H.; HAKES, T.B.; OCHOA, M.; LEWIS, J.L..(1.986). "A Review of second Look laparotomy for ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 23(1): 14-25

30. CARDA, P.; GARCIA PARTIDA, P.; GONZALEZ GONZALEZ, F..(1.970). "Aportación a la Biopatología del Carcinoma ascítico de Ehrlich" Rev. Esp. Oncol., 16: 119-129

31. CARDA, P.; GALLEG0, E.; MATEOS, E.; RODRIGUEZ, M.; CASTAÑO, M..(1.981). "Nutrición y cáncer: Posible influencia de la dieta alimenticia sobre la incidencia y desarrollo del carcinoma mamario implantado en ratones C₃H/He-M II. Influencia del contenido proteico de la dieta en animales adultos". Rev. Esp. Oncol. XXI. Fasc 2.

32. CARDA, P.; GALLEG0, E.; RODRIGUEZ, M.; CASTAÑO, M..
(1.974). "Biopatología de las ratonas C₃H/ he-M,
portadoras de carcinoma mamario espontáneo, sometidas a
dietas alimenticias con distintos niveles proteicos.
Rev. Esp. Oncol. Vol XXI. Fasc 2.

33. CARRASCO DE LA PEÑA, J.(1.982). "El método
estadístico en la investigación médica". Ed Karpos, S.A.
Madrid.

34. CARRATO, A.; SANZ ESPONERA, A..(1.964). " Symposium
sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia
oncológica". I.N.O.,Sandoz. 33 (1.964)

35. CASTAÑO, M.; DIAZ-YUBERO, M.A.; PICKERING, X.;
RODRIGUEZ, M..(1.977) "Efecto del tratamiento con
levamisol sobre ratones C₃H/ He-M hembras, con implantes
de tumor de Bittner (Adenocarcinoma mamario). Rev. Esp.
Oncol. 24: 303-309

36. CARTER, S.K.; UMEZAWA, H..(1.976). "GANN Monograph
on Cancer Research". Univ. of Tokyo Press, Tokyo. 19:

3-36

37. CHEVILLE, N. (1980). "Patologia Celular " Ed.

38. CHIEN M.; GROLLMAN, A.P.; HORWITZ, S.B. (1977).
 "Bleomycin-DNA interactions: Fluorescence and Proton
 Magnetic Resonance Studies." Biochemistry 16: 3641-3647
 (1977)

39. CHOICE, D.D.; LONGNECKER, D.S.; DEL CAMPO, A..
 (1981). " Acute and chronic Cisplatin nephropathy in
 rats". Lab. Invest. 44(5): 397-402 (1981)

40. CORDER, M.P.; ELIOT, T.E.; BELL, S.. (1977)
 J. Clin. Hematol. Oncol. 7(2): 645-651 .Citado por
 Umezawa, H.

41. CORMIER, W.J.; HAHN, R.G.; EDMONSON, J.H.; EAGAN
 R.T. (1980). "Phase II study in advanced sarcoma:
 Randomized trials of Pyrazofurin versus combination
 Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis-

dichlorodiammineplatinum II (CDC).". Cancer Treat. Rep.
64: 655-658

42. CREAGAN, E.T.; FLEMING, T.R.; EDMONSON, J.H.; INGLE,
J.N.; WODDS, J.E.. (1.981). "Cyclophosphamide, Adriamycin
and Cis-diamminedichloroplatinum in the treatment of
patients with advanced head and neck cancer. Cancer
47:240-244

43. CRISTAL, R.G. (1.974). " Lung collagen: definition,
diversity and developement". Fed. Proc. 33:2248-2255

44. DENK, H.; KREPLER, R.; LACKIGER, E.; ARTLIEB U.;
FRANKE, W.W. (1.982). "Biochemical and Immunocytochemical
Analysis of the Intermediate Filament Cytoskeleton in
Human Hepatocellular Carcinomas and Hepatic Neoplastic
Nodules of Mice. Lab. Invest. 46(6): 584-596

45. DE SOMBRE, E.R.; ANDERSON, W.A.; KANG, Y.H..
(1.975). "Identification, subcellular localisation and
estrogen regulation of peroxidase in 7,12 DMBA-induced
rat mammary tumours. Cancer Res. 35: 172-179

46. DI MARCO, Cancer Treat. Rep. 61: 893-894 (1.977).

Citado por Umezawa, H., 1.979

47. DI PAOLO, J.A..(1.962). "Esttablisement of long-term cultures of Ehrlich ascites tumor cel". Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 109: 616-623

48. EAGAN, R.T.; FRYTAK, S.; INGLE, J.N.; CREAGAN E.T.; NICHOLS, W.C.; KVOLS, L.K..(1.980). "Phase II evaluation of the combination of Triazine, Cychlophosphamide, Doxorubicin and Cis-dichorodiammineplatinum II in patiens with advanced adenocarcinoma of the lung". Cancer Treat. Rep. 64(8-9): 925-928

49. EHRLICH, P.; APOLANT, H.. Berl. klin. Wchnsch. 42:847 (1.905). Citado por Carda, 1.976

50. ETtinger, L.J.; DOGLAS, H.O.; HIGBY, D.J.; MINDELL, E.R.; NIME, F.; CHOORAH, J.; FREEMAN, A.I..(1.981) "Adjuvant Adriamicin and Cis-diamminedichloropatinum (Cis-platinum) in primary osteosarcoma". Cancer 47:

248-254

51. EUSEBI, V.; CERASOLI, P.T.; GUDELLI-GUIDI, S.; GRILLI, S.; BUSSOLATI, G.; AZZOPARDI, J.G..(1.981) "A two-stage immunocytochemical method for oestrogen receptor analysis: correlation with morphological parameters of breast carcinomas". Tumor 67:315-323

52. EVANS, D.J..(1.983). " Intermediate Filaments in Diagnostic Histopathology". Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology. Edited by J.M. Polak and S. Van Noorden. Ed. Wright-PSG. 295-301

53. FLEICSHMAN, R. W.; STADNICKI, S.W.; ETHIER M.F.; SCHAEPPI, H..(1.975). " Ototoxicity of Cis-dichloro diammineplatinum II in the guinea pig". Toxicol. Appl. Pharmacol. 33: 32-322

54. FLEICSHMAN, R.W.; BAKER, J.R.; THOMPSON, G.R.; SCHAEPPI, U.H.; ILLIEVSKI, V.R.; COONEY, D.A.; DAVIS, R.D.. (1.975). "Bleomycin induced intestinal pneumonia in dogs. Thorax 26: 675-686

55. FEUM, L.G.; SAMSOM, M.K.; STEPHENS, R.L.. (1. 980).
"Vinblastine (VLB), Bleomycin (BLEO),
Cis-diamminedichloroplatinum (DDP) in disseminated
extragonadal germ cell-tumors. Cancer 45: 2453-2459

56. FLORES, J. M.. (1.984). "Estudio Biológico y
anatomopatológico del carcinoma espontáneo de la ratona
C₃H/He-M injertado a ratones tratados con Vincristina,
Cloruro de Prospidio y Adriamicina. Ed. de la
Universidad Complutense de Madrid.

57. FLORES, J.M.; GALLEG0, E.; CASTAÑO, M.; GALLEG0,
A..(1.983). "Adenocarcinoma tipo A injertado a ratones
C₃H/ He-M sometidos a tratamiento con diversos
antiblasticos:I.Estudio biológico."Rev. Esp. Oncol.,
30(3): 337-359

58. FLORES, J.M.; GALLEG0, E.; CASTAÑO, M.; GONZALEZ,
J.L..(1.983). "Adenocarcinoma mamario tipo A injertado a
ratones C₃H/he-M sometidos a tratamiento con diversos
antiblasticos:II.Estudio biológico. Rev. Esp. Oncol.,
30(3): 337-359

59. FOYE, W.O.. (1.984). "Principios de Quimica Farmaceutica". Ed. Reverté S.A.. Barcelona. 904

60. FRAM, R.; CUSIK, P.S.; MARINOS, M.G.. (1.986). "Studies on mutagenesis and repair induced by platinum analogs". Mutat. Res. 173(1): 13-18

61. FUJI, A.; TAKITA, T.; MAEDA, K.; UMEZAWA, H.. (1.973). "New components of Bleomycin". J. Antibiotics, XXVI(7): 396-397

62. GUDE, W.; COSGROVE, G.; HIRSCH, G.. (1.982). "Histological Atlas of the Laboratory Mouse". Ed. Plenum Press. New York and London.

63. HACKMANN, C.H.. (1.952). Z. Krebsforsch, 58:607. Citado por Umezawa, H., 1.979)

64. HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E.. (1.977). "Biologia y clinica de conejos y roedores". Ed Acribia.

65. HARDER, H.C.; ROSENBERG, B.. (1.970). "Inhibitory

effects of antitumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. Int. J. Cancer, 6: 207-216

66. HASEGAWA, Y.; MORITA, M.: (1985). "Antitumor effect on oral Cisplatin on certain murine tumors. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 33(12): 5511-5514

67. HAUSCHA, T.S.; LEVAN A..(1951).Anat. Record. 111-146. Citadompor Carda, P.,1976

68. HEINEEN, R.; BASSLEER, R..(1976). "Mode of action of Cis-dichlorodiammineplatinum II on mouse Ehrlich ascites tumour cells. Biochem. Pharmacol. 25(16): 1.871-1.876

69. HESS, P.W.. (1977). "Principles of cancer chemotherapy of canine and feline tumors". J.A.A.H.A. 12: 350-358

70. HESS, P.W.; Mc EWEN, E.G.; Mc CLELLAND. (1976). "Chemotherapy of canine and Feline Tumors". J.A.A.H.A.,

12(3): 350-358

71. HEYDERMAN, E..(1.983). "Tumors Markers". Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology. Ed. by J.M. Polack and S. Van Noorden. Ed. Wriqth-PSG. 274-294

72. HILFR, R.; FREEMAN, J.J.;MICHEL, I.;BOORMAN, A.. (1.964). "Caracterization of a transplantable lactating mammary tumour: endocrinological, morfphological and biochemical aspects. Cancer Res. 24:812-824

73. HIROSHI, J.; EHRENFELD, G.M.; SHIPLEY, J.B.; KILKUKIE, R.E.; CHANG, L.; HECHT, S.M..(1.986). "DNA strand scission by Bleommicyn group antibiotics. J. Nat. Prod. (Lloydia), 48(6): 869-877

74. HONG, W. K.; SHAPSHAY, S.M.; BUTANI, R.; CRAFT, M.L.; UCHAKLI, A.; YAMAGUCHI, T.; VAUGAN, C.W.; STRONG, M.S..(1.979). "Induction chemotherapy in advanced squamous head and neck carcinoma with hig-dose Cisplatinum and Bleomycin infusion. Cancer, 44:19-25

75. HOWLE, J.; GALE, G.; SMITH, A.R..(1.976). " A proposed mode of action of antitumour platinum compound based upon studies with cis-dichloro ((G₂-H) dipurine) platinum II. Biochem. Pharmacol. 21: 1.465-1.469

76. HULL, R.N..(1.9.53). "Established long-term cultures of mammalian normal, solid tumor and ascites tumor cells on glass. Science, 117:223-230

77. INABA, T; TAKAHASHI, N.; MATSUDA, H.; IMORI, T. . (1.984). "Estrogen and Progesterone Receptors and Progesterone Metabolism in Canine Mammary Tumours. Jpn. J. Vet. Sci., 46(6): 797-803

78. ISHIZUKA, M.; TAKAYAMA, H.; TAAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H..(1.967). "Activity and toxicity of Bleomycin. J. Antibiot., 20: 15-24

79. JACOBS, C.H.; KALMAN, S.M.; MAUREEN, T.R.; WEINER, M.W..(1.980). "Renal handling of Cis-diamminedichloroplatinum II. Cancer Treat. Rep., 1.223-1.226

80. JANSSON, B.; REVESZ, L..(1.976). "A deductive approach to the analysis of the growth of ascites tumor cell populations. Methods in Cancer Research, XIII:227-290

81. JENSEN, E.V..(1.981). "Hormonodependency of breast cancer: Cancer, 47:2.319-2.326

82. JONGEJAN, H.T.; PROVOOST, M.A.; WOLF, E.D..(1.986). "Nephrotoxicity of Cisplatin comparing young and adult rats. Pediatr. Res. 20(1): 9-14

83.KARAKOUSIS, C.P.; HOLTERMANN, O.A.; HOLYKE, E.D. . (1.979). "Cis-dichlorodiammineplatinum (II) in metastasis soft tissue sarcomas. Cancer Treat. Rep. 63: 2.0711-2.075.

83. KARAKOUSIS, C.P.; HOLTERMANN, O.A.; HOLYOKE, E.D..(1.979). "Cis-diamminedichloroplatinum II in metastasis soft tissue sarcomas". Cancer Treat. Rep., 63:2.071-2.075

84. KELLER-SHIERLEIN, W.; RICHLE, W.. (1.980). "Antimicrobials Aspects and Chemotherapy".Ed. G.L. Hobby Am. Soc.. Microbiol. Maryland., 68-77

85. KELMAN, A.D.; PERESIE, H.J..(1.979). "Mode of DNA binding of Cis-platinum II antitumor durgs: a base sequence-dependent mechanism is proposed". Cancer Treat. Report., 63(9-10): 1.445-1.452

86. KEPPLER, B.K.; RUPP, W..(1.986). "Antitumor activity of imidazolium-bimidazole-tetrachlororuthenate II: A representative of a new class of inorganic antitumor agents". Cancer Res. Clin. Oncol., 111(2): 116-168

87. KING, D.W.; PAULSON, S.R.; HANNAFORD, N.C.; KREES, A.T.; DEAT, I..(1.959). "The effects of Injury on the Proteins deoxyribonucleic Acid Tumor Cells". Am. J.

Pathol., 20: 369-381

88. KING, G.W.; HALPIN, J.J.; SITH, R.E.; BATLEY, F; SCHULLE, D.E.. (1.979). "Cis-dichlorodiammineplatinum II, Methotrexate, Bleomycin and Vincristine in head and neck cancer: a pilot study". Cancer Treat. Rep., 63: 1.735-1.738

89. KOCIBA, R.J.; SLEIGHT, S.D.; ROSEMBERG, B.. (1.970). "Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with Cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875)". Cancer Chemoter. Rep., 54:325-328

90. KRAKOFF, I.; YAGODA, A. Citados por Blum, R.H., 1.973

91. KUNIMOTO, T; HORI, M.; UMEZAWA, H.. (1.967). "Mode of action of phleomycin in HeLa-S₃ cells in synchronized culture". J. Antibiot., 20: 277-281

92. KURMAN, R.J.; ANDRADE, D.; GOEBEL-SMANN, U.; TAYLOR, C.R.. (1.978). "An immunohistological study of steroid

localization in Sertoli-Leydig tumors of the ovary and testis". Cancer, 42: 1.772-1.783

93. LAZARIDES, E..(1.980). "Intermediate filaments as a mechanical integrator of cellular space". Nature, 283: 249-256

94. LEE, S.H..(1.980). "Cellular Estrogen and Progesterone Receptors in Mammary Carcinoma". Am. J. Clin. Path. 73(3): 323-329

95. LEBELT, A.G.; LIEBELT, R.A..(1.979). "Transplantation of tumors". Methods in Cancer Research. Ed. Academic Press, I: 143-242

96. LOEWENTHAL, H.; JAHN, G..(1.932). Zeitschrift fur Krebs forschung, 37: 439. Citado por Carda, P., 1.976

97. LOVIE, A.C.; EVANS, T.L.; SIKIC, B.L..(1.980). "Interaction of other anticancer drugs with Bleomycin in an animal model of pulmonary toxicity". Proc. Am. assoc. Cancer Res., 21:290-298

98. MAGNOL, J.P.; SAATI, T.; DEL SOL, G.. (1.985).
 "Marquage immunocytochimique des cytokératines des
 carcinomes canins". Rev. Med. Vet., 136: 357-362

99. MARTIN, P.M..(1.983). "Methodes de detection et de
 quantification des recepteurs hormonaux dans le cancer
 du sein". Path. Biol., 9:723-740

100. Mc GUIRE, W.L..(1.978). "Breast Cancer. Advances in
 research and Treatment.Experimental Biology". Ed. Plenum
 Medical Book Company.New york and London.

101. Mc GUIRE, W.L.; HORWITZ, K. B..(1.975). "Hormone
 receptors and endocrine therapy in human breast cancer".
 Hormones and Breast Cancer.I.N.S.E.R.M., 39-44

102. MERSKI, A..(1.976). "Effects of Adriamycin on
 Ultrastructure of Nucleoli in the Heart and liver cells
 of the rat". Cancer Res. 36: 1.580-1.588

103. MIALOT, J.P.; ANDRE, F.; MARTIN, P.M.; COTARD,
 M.P.; RAYNAUD, J.P..(1.981). "Etude des recepteurs des

hormones steroides dans les tumeurs mammaires de la chienne.I. Mise en evidence, caracterisation et relation avec le type histologique". Rec. Med. Vet., 158(2): 215-221.

104. MINGUEZ, I..(1.978)."Sales complejas de Platino y Osmio y consumo de oxigeno". Tesina para grado de licenciatura. AAaniversidad Complutense de Madrid.Facultad de Veterinaria.

105. MOORE, J.; KIELER, J.; BICZOWA, B..(1.968). "Comparative studies of a Near-Tetraploid and Near-Diploid Line of Ehrlich Ascites Tumor Propagated in vivo and in vitro II. Cytology and Transplantatibility." Europ. J. Cancer, 4: 81-95

106. MOULTON, J.E..(1.978). "Tumors in Domestic Animals" 2 Ed. University of California Press.Ltd London,England, 346-369

107. MUGGIA, F.M.; LOVIE, A.C.; SIKIC, B.I..(1.983). "Pulmonary toxicity of antitumor agents". Cancer Treat.

Rev., 10:221-243

108. MIYAKI, M.; MOROHASI, S.; ONO, T..(1.973). "Single strand scission and repair of DNA in Bleomycin sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells". J. Antibiot., 26: 369-372

109. MONACO, M.R.; BRONZER, D.A.; TORMEY, D.C.; WAALKES, P.; LIPPMAN, M.E..(1.977). "Casein production by human breast cancer". Cancer Res. 37: 749-754

110. NAGAI, K.; SUZUKI, H.; TANAKA, N.; UMEZAWA, H.. (1.969). "Decrease of melting temperature and single strand scission of DNA by Bleomycin in the presence of hydrogen peroxidase". J. Antibiot., 22: 624-628

111. NAGAI, K.; SUZUKI, H.; TANAKA, N.; UMEZAWA, H.. (1.969). "Decrease of melting temperature and single strand scission of DNA by Bleomycin in the presence of 2 mercaptoethanol". J. Antibiot., 22: 569-574

112. NAGASAWA, H..(1.981). " Hormones and Experimental mammary Tumorgénesis". Hormone Realted Tumours, 137-163.

113. NAGATSU, M.J.; OKAZAKI, T.; RICHART,M.; LAMBERT, A. (1.971). "Effect on Bleomycin on nuclear DNA in transplantable VX-2 carcinoma of rabbit". Cancer Res.,31: 992-997

114. NICOLSON, G.L.; BRUNSON, K.W..(1.978). "Specificity of Arrest. Survival and Growth of selected Metastatic Variant Cell lines." Cancer Res., 38(11): 4.105-4.111

115. NICOLSON, G.L..(1.978). "Experimental Tumor Metastasis". Bioscience 28(7): 441-447

116. NICOLSON, G.L..(1.986). "Metástasis cancerosas". Investigación y Ciencia: El Cáncer.Ed. Prensa científica 142-153

117. NORRIS, A.M.; WITHROW, S.J..(1.984). "A review of Cancer Chemotherapy for pet Animals". Can. Vet. J.,25(4) 153-157

118. OFFERMAN, J.J.G.; MEIJER, S.; SLEIJFER, N.H.;
DONKER, A.J.; SCHRAFFORTD, K.H.; NAN DERHEM, G.K..
(1.985). "The influence of verapanil on renal function in
patients treated with Cisplatin." Clin. Nephrol. 24(5):
249-255

119. OLD, L.J.. (1.986). "Inmunología del Cáncer".
Investigación y Ciencia: El Cáncer. Ed. Prensa
Científica, 154-168

120. OSBORN, M.; WEBER, K.. (1.983). "Tumor Diagnosis by
Intermediate Filament Typing: A novel Tool for Surgical
Pathology". Lab. Invest. 48(4): 372-394

121. OWEN, L.N.. (1.983). "Cancer chemotherapy and
immunotherapy". Ettinguer S.J. Textbook of Veterinary
internal medicine. 2 Ed.. Ed Philadelphia: W.S. Saunders
Co., 369-392

122. PARODI, A.L.; MIALOT, J.P.; MATIN, P.M.; COTARD, M.;
RAYNAUD, J.P.. (1.984). "Canine and Feline Mammary
Cancers as Animal Model for Hormone Dependant Human

Breast Tumors: Relationships Between Steroid Receptor Profiles and Survival Rates." Progress in Cancer Res. and Ther., 31: 357-365

123. PEREZ CUADRADO, S.; MORENO KOCH, M.C.; TOME PAULE, C..(1.975)."Quimioterapia coadyuvante tras cirugía I. Estudio comparativo de distintos preparados antineoplásicos en animales de experimentación." Rev. Esp. Oncol.,22: 249-272

124. PEREZ CUADRADO, S.; MORENO KOCH, M.C;TOME PAULE, C..(1.975).."Quimioterapia coadyuvante tras Cirugía II. Estudio comparativo de diferentes preparados antineoplásicos en distintas situaciones experimentales" Rev. Esp. Oncol., 22: 273-286

125. PEREZ CUADRADO, S; MORENO KOCH, M.C.; TOME PAULE, C.; MARTIN CINTO, C..(1.976). "Quimioterapia coadyuvante tras cirugía III. Estudio comparativo del efecto antineoplásico de la quimioterapia en distintos momentos tras la cirugía: modelo CaM, Cloruro de Prospidio". Rev. Esp. Oncol. 23: 261-291

126. PHAN, S.H.; THRALL, R.S.; WARD, P.A..(1.980).
"Bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats:
biochemical demonstration of increased rate of collagen
synthesis." Am. Rev. Rep. Dis., 121: 501-506
127. PIZZOCARD, G.; SALVION, R.; ZANONI, I.; MILANI, A.;
PIVA, L..(1.986). "Successful treatment of good-risk
disseminated testicular cancer with Cisplatin,
Bleomycin and reduced-dose vinblastine." Cancer (Phila),
57(11): 2.114-2.118
128. PRESTAYKO, A.W.; DAoust, J.G.; ISSEL, B.F.;
CROOKE, S.T..(1.979). "Cisplatin (Cis-diamminedichloro-
platinum II)". Cancer Treat. Rep., 6: 17-39
129. POTMESNIL, M.; GOLDFEDER, A..(1.971). "Nucleolar
Morphology, Nucleic Acid Syntheses, and Growth Rates of
Experimental Tumors". Cancer Res., 31: 798-783
130. POSTLETHWAITE, G.; Mc PHERSON, J.A..(1.963). "In
vitro growth of the Landschutz ascites tumour with

retention of hig mouse virulence."Br. J. Cancer, 17(2):
487-452

131. ROBERTS, J.J.; PASCOTE, J.M..(1.972).
"Cross-Linking of complementary strands of DNA in
mamalian cells by antitumor platinum compounds." Nature,
235: 282-284

132. RAJENDRA, R.; LURIE, S.; SEYER, J.M.;
KANG,A.H..(1.985)."Profiles of steady-state levels of
RNA messeger Coding for Tipe I procollagen, elastin and
fibronectin in hamsters lungs undergoing
Bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis."J.
Clin. Invest. 76(5): 1.733-1.735

133. ROEUSTELLI G.; PELLEGRINI, A.;GANZIA, F..(1.980).
"Chemotherapy and Hormonal Treatment of Advanced Breast
Cancer". Ed. by Farmitalia Carlo-Erba S.A.

134. ROSEMBERG, B.(1.975).Cancer Chemother Rep. 59(3):
589-597. Citado por Rosemberg, B.,

135. ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L..(1.969). "Platinum compounds: a new Class of potent antitumor agents." Nature, 22: 385-386

136. ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J.E.; MANSOUR, V.H..(1.969). "Platinum compuonds: a new class of potent antitumor agents." Nature, 222: 385-386

137. ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L..(1.970). "Successful regresion of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds." Cancer Res. 30: 1.799-1.802

138. ROSEMBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T..(1.965). "Inhibition of cell division in "Escherichia coli" by electrolysis products from a platinum electrode." Nature 205: 698-699

139. SAN MIGUEL, J.; GONZALEZ, M..(1.986). "Anticuerpos monoclonales en la investigación oncológica". Investigación y Ciencia: El Cáncer. Ed. Prensa Científica, 139-141

140. SANTOS, E..(1.986). "Técnicas e investigación en Oncología". Investigación y Ciencia: El Cáncer. Ed. Prensa Científica, 58-61

141. SARNA, G.; SKINNER, D.G.; SMITH, R.B.; ZIGHELBOIM, J.; GOODNIGHT, J.E.; FEIG, S..(1.980). "Cis- diamminedi- chloroplatinum II alone and in combination in the treatment of testicular and other malignances." Cancer Treat. Rep., 64: 1.077-1.082

142. SARTORELLI A.C..(1.965). "Aprochaes to the combination Chemotherapy of Transplantable Neoplasms." Prog. Exp. Tumor Res., 6: 228-288

143. SATO, H.; ICHIMURA, H..(1.969). "Effect of bleomycin on rat ascites hepatoma." Igaku No Ayum, 69: 669-667

144. SATO, H.; SAITOH, H.; MIZUKOSHI, O..(1.979). "Clinical effects of NK 831 (Pepleomycin) against malignant tumors of the head and neck." Jpn. J. Antibiot., 32(7): 751-755

145. SHOUSA, S.; HYSSIOTIS, T.; GODFREY, V.M.; SCHENER, P.J..(1.979). "Carcinoembryonic antigen in breast cancer tissue: a useful prognostic indicator". Br. Med. J., 1: 777-779

146. SCHABEL, F.M..(1.969). "The use of tumor growth Kinetics in planing "curative" Chemotherapy of advanced solid tumors." Cancer Res. 29: 2384-2390

147. SCHABEL, F.M.; TRADER, M. W.; LASTER, W. R.; CORBETT, T.H.; GRISWOLD, D.P..(1.979). "Cis-dichlorodiammineplatinum (II): Combination chemotherapy and cross- resistance studies with tumours of mice." Cancer Treat. Rep., 63(9-10): 1.459-1.473

148. SCHAEPPPI, U.; PHELAN, R.; STADNICKI, S.W.; FLEISCHMAN, R.W.; HEYMAN, I.A.; ILLIEVSKI, V.; REDDING, R.A..(1.974). "Pulmonary fibrosis following multiple treatment with Bleomycin (NSC-125066) in dog." Cancer Chemother. Rep., 4:31-39

149. SCHAEPPPI, U.; THOMSON, G.F.; FLEICHMAN, R.W.; BAKER, J.R.; ROSENKRANTZ, H.; ILLIEVSKI, V.; COONEY, D.A.; DAVIS, R.D..(1.973). "Preclinical toxicologic evaluation of Bleomycin (NSC-125066) in rhesus monkeys." Cancer Chemother. Rep., 4: 31-39

150. SCHEULEN, M.E.; SEEGER, S.; SCHILCHER, R.B.; MEIER, C.R.; SCHIMIDT, C.G..(1.980). "Sequential combination chemotherapy with Vimblastine-Bleomicin and Duxorubicin-Cis-dicamminedichloroplatinum II disseminated non seminomatous testicular cancer." Cancer Treat. Rep., 64: 599-609

151. SNIDER, G.L.; CELLI, B.R.; GOLDTEIN, R.H.; O BRIEN, J.J.; LUCEY, E.C..(1.978). "Cronic intestinal pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin." Am. Rev. Respir. Dis., 117: 289-297

152. SNIDER, G.L.; HAYES, J.A.; KORTHY, A.L..(1.978). "Cronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal Bleomycin." Am. Rev. Respir. Dis., 117: 1.099-1.108

153. SIKIC, B.I.; COLLIINS, J.M.; MIMNAUGH, E.C.; CRAM, T.E..(1.978). "Improved therapeutyc index of Bleomycin when administered by continuous infusion in mice." Cancer Treat. Rep., 62: 2.011-2.017

154. SIKIC, B.I.; COLLINS, J.M.; MIMNAUGH, E. C.; CRAM, T.E.(1.978). "Improved therapeutyc index of Bleomycin When administered by continuous infusion in mice.II" Cancer Treat. Rep. 62: 2.011-2.017

155. SKOVGAARD, P.; OZZELLO, L.; KING, W.J.; GREENE, G.L..(1.985). "The use of Monoclonal Antibodies to Estrogen Receptors (ER) for immunoperoxidase Detection of ER in Paraffin Section s of Human Breeast Cancer Tissue." The Jorunal of Histochemistry and Citochemistry 33(2): 87-92

156. SPAULDING, M.; PATRICIA, Z; NAN, S; KLOTCH, D.; LEE, K..(1.986). "Induction Therapy in head and neck cancer: A comparison of two regimens." Cancer (Phila), 57(6): 1.110-1.114

157. STERLING, K.M.; DI PETRILLO, T.; CUTRONEO, G.R.; PRESTAYKO, A..(1982). "Inhibition of collagen accumulation by glucocorticoids in rat lung after intratracheal Bleomycin instillation." Cancer Res., 42: 405-410

158. STRANDBERG, M.C.; BRESNIC, E.; EASTMAN, A..(1982). "Significance of DNA cross-linking to cis-diamminechloroplatinum (II) induced cytotoxicity in sensitive of murine Leukemia L1210 cells." Chem. Biol. Interact., 39(2): 149-160

159. SUZUKI, H.; NAGAI, K.; AKUTSU, E.; YAMAKI, H.; TANAKA, N.; UMEZAWA, H..(1968). "Mechanism of action of Bleomycin. Studies with the growing culture of bacterial and tumors cells. J. Antibiotics. 21: 379-383

160. STEVEN, D.; SCHAEFFER, M.D.; WRIGHT, C.G.; POST, J.D.; FRENKEL, E.P..(1981). "Cisplatinum vestibular toxicity". Cancer 47: 857-859

161. SUZUKI, H.; NAGAL, K; TANAKA, H.N.; UMEZAWA, H..(1.968). "Mechanism of action of Bleomycin with the growing culture of bacterial and tumor cells." J. Antibiotics, 21: 379-386

162. TAKAHASI, K.; YOSHIOKA, O.;MATSUDA, A.;UMEZAWA, H.. (1.977)."Intracellular reduction of the cupric ion Bleomycin copper complex and transfer of the cuprous ion to a cellular protein".J. Antibit., 31: 861-869

163. TAKITA, T.;MURAOKA, Y; NAKATANI,T; FUJI, A.; UMEZAWA, Y.;NAGANAWA, H.; UMEZAWA, H..(1.977).J. Antibiot.,31: 801-804

164. THRALL, R.S.; Mc CORMICK, J.R.; JACK, R.M.;Mc REYNOLDS R.A.; WARD, P.A..(1.979)."Bleomycin induced pulmonary fibrosis in the rat". Am. J. Pathol., 95: 117-127.

165. TURUCSON, V.S..(1.973). "Pathology of tumours in Laboratory Animals.I." World Health Organization International Agency for Research Cancer. Ed. Board

166. TURUCSON, V.S..(1.982). "Pathology of tumours in Laboratory Animals II." World Healt Organization International Agency for Research Cancer.Ed. Board
167. TURUCSON, V.S..(1.982). "Pathology of tumours in Laboratory Animals III." World Healt Organization Interntional Agency for Research on Cancer.Ed. Board
168. UMEZAWA, H..(1.953). J. antibiot. Ser.Citado por Umezawa, H., 1.971
169. UMEZAWA, H..(1.971). "Natural and artificial Bleomycins. Chemistry and antitumor activity." Pure Appl. Chem., 28: 665-670
170. UMEZAWA, H.; ISHIZUKA, M.; MAEDA, K.; TAKEUCHI, T.. (1.967). "Studies on Bleimycin". Cancer, 20: 891-895
171. UMEZAWA, H..(1.974). "Chemistry and mechanism of action of Bleomycin". Fed. Proc., 33(11): 2.296-2.302
172. UMEZAWA, H..(1.979). "Cancer drugs of

microbiological origin." Methods in Cancer Res..Ed.
Academic Press, XVI: 43-72

173. U.S. Departement of Healt and Human Services
(National Cancer Institute Monograh 54).(1.981) "The
occurrence of tumors in Domestic Animals". Ed. Staff

174. VOLG, S.E.; KAPLAN, B.H..(1.979). "Chemotherapy of
advanced head and neck cancer with methotrexate,
bleomycin and cis-diamminedichloroplatinum II in a
effective on patient schedule. Cancer, 44: 26- 31

175. WAHEREN, B.; LIDBRINK, E.; WALLGREN, A.; ENEROTH,
P.; ZAJICEK, J..(1.978)."Carcinoembryonic antigen and
others tumor markers in tissue and serum or plasma of
patients with primary mamary carcinoma. Cancer, 42:
1.870-1.878

176. WALKER, R.A..(1.980). "Demonstration of
carcinoembryonic antigen in human breast cancer by the
immunoperoxidase thecnique." J. Clin. Patholl., 33:356-
360

177. WAKAKY, S.(1.958). Antibiot. Chemother., 8: 228-240. Citado por Umezqwa, H., 1.979

178. WARD, J.M.; FAUVIE, K.A..(1.976)."The nephrotoxic effects of Cis-diamminedichloroplatinum II (NCS-119875) in male F 344 rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 38: 535-538

179. WEISS, L..(1.977). "A pathobiologic Overview of Metastasis". Seminars in oncology, 4(1): 5-19

180. WELSCH, C.W. (1.971).Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 12: 25-32.Citado por Jensen, E.V., 1.981

181. WILTSHAW, E.; KRONER, T..(1.976)."Phase II. Study of Cis-dochlorodiammineplatinum II (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary".Cancer Treat. Rep., 60: 65-60

182. WILLEY, P.F. (1.979).J. Am. Chem. Soc. 99:542-549
Citado por Mialot, J.P., 1.981

183. WOLPERT DE FILIPPES, M.K..(1.979). "Antitumor activity of Cis-dichlorodiammineplatinum II". Cancer Treat. Rep., 63(9-10): 1453-1458

184. ZWELLING, L.A.; KOHN, K.W..(1.979). "Mechanism of action of Cis-dichlorodiammineplatinum II." Cancer Treat. Rep., 63(9-10): 1.439-1.444

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A la profesora Dra. Da. María Castaño Rosado, por la ayuda personal y científica que me ha prodigado desde que comencé a estudiar y trabajar junto a ella en el campo de la Anatomía Patológica y de manera muy especial en el curso de esta Tesis Doctoral.

Al profesor Dr. D. Eduardo Gallego García, que ha sido nuestro maestro orientándonos de manera definitiva en nuestra formación investigadora y docente

Al profesor Dr. D. Juan Badiola por el apoyo profesional y personal que me brindado tan desinteresadamente, sin cuya ayuda no habría sido posible terminar este trabajo.

También estoy profundamente agradecido a mi compañera de trabajo Dra. Da. Juana María Flores por su incondicional y amistosa colaboración.

Igualmente doy las gracias a D. Simón vivas por su colaboración técnica en el terreno de la Microscopia Electrónica, y al resto del profesorado del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Madrid que, de una manera u otra, ha contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral

TUMOR	DOSIS	ACTIVIDAD
MELANOMA B16	0.15-0.20 IP	++
CARC. MAMA CD8F1	4-12,5 IP	++
TUMOR COLON 26	2-4 IP	++
TUMOR COLON 38	4-16 IP	+
LEUCEMIA L1210	0.25-4 IP	++
TUMOR DE LEWIS	0.5-2 IP	-
LEUCEMIA P388	0.25-2.5 IP	++
EPENDIMOBlastoma	0.8-2 IP	+

TABLA I. Actividad antitumoral del Cisplatino en modelos experimentales del ratón.

IP = Administración intraperitoneal

++ = Respuesta muy buena

+ = Respuesta buena

- = No responde al tratamiento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cisplatino	++	++	+	++	+	++	+	-	-
Metotrexato.....	-	-	-	-	++	-	+	-	-
6-Mercaptopurina -	+	++	+	++	+	+	++	-	-
Melfalan.....	++	++	+	++	+	++	-	-	-
5 Fluoracilo....	+	++	+	++	++	++	++	-	-
Ciclofosfamida..	+	++	++	++	++	++	++	++	-
Vincristina	++	-	-	+	++	++	++	-	-
Adriamicina.....	++	++	-	++	+	++	-	-	-
PCNU.....	+	++	+-	++	++	+	+	-	-
Actinomicina D..	++	+	+	+	-	++	+	-	-

TABLA II. Comparación de la actividad del cisplatino con otros agentes antineoplásicos activos (183)

1: Melanoma B16; 2: Carcinoma mamario CDBF1 ; 3: Tumor de colon 26; 4: Tumor de colon 38; 5: Leucemia L 1210; 6: Leucemia de Lewis; 7: Leucemia P 386; 8: Carcinoma de mama MX-1; 9: Carcinoma de pulmón LX-1

	perro	mono

dosis no		
tóxica	0.625 mg/kg	0.156 mg/kg
dosis		
tóxica baja	1.25 mg/kg	0.313 mg/kg
dosis		
tóxica alta	2.5 mg/Kg	1.25 mg/kg
dosis letal	--	2.5 mg/Kg

Las cantidades están referidas a una sola dosis

TABLA III. Toxicidad del Cisplatino

ESPECIE	DOSIS		PARAMETROS ESTUDIADOS
Ratón	0.4-4 mg/kg	IP	EM, EL
	10 mg/ kg	IP	EM, LM, Fosfolípidos
	20-100 mg	IP	LM, EM
Rata	2.5-10 mg	IP	LM, EM
Hamster	1-10 microg/kg	IP	LM, DLCO, OH-pro, Elastina, DNA, C-prolina, perm. vas. síntesis de colágeno síntesis proteica
Conejo	5 mg/ Kg	SC	LM, EM, DNA, proteínas, OH-pro, Glicosaminoglicano
Perro	0.3-5 mg/kg	IV	LM
Mono	0.25-4 mg/kg	IV	LM

TABLA IV. Toxicidad pulmonar de la Bleomicina en diversos modelos experimentales.

EM= Microscopio Electrónico; LM= Microscopio de transmisión; OH-pro= Hidroxiprolina; DLCO= Difusión del monóxido de carbono.

RATONES	LOTES	FINALIDAD DEL GRUPO

.	a) 5 ratones	
10		Obtencion de la forma sólida
	b) 5 ratones	

	T 1, 5 ratones	
15	T 2, 5 ratones	Lote testigo
	T 3, 5 ratones	

	C 1, 5 ratones	
15	C 2, 5 ratones	Admon de Cisplatino
	C 3, 5 ratones	

	B 1, 5 ratones	
15	B 2, 5 ratones	Admon de Bleomicina
	B 3, 5 ratones	

	C+B 1, 5 ratones	Administración de
15	C+B 2, 5 ratones	Cisplatino y Bleo-
.	C+B 3, 5 ratones	micina

	LOTE T			LOTE C			LOTE B			LOTEC+B		
DIA	AN.	UL	%	AN.	UL	%	AN.	UL	%	AN.	UL	%
0	15	0	0	15	0	0	15	0	0	15	0	0
7	15	0	0	15	0	0	15	0	0	15	0	0
14	15	1	6.6	15	0	0	15	0	0	15	5	33
21	15	7	46.6	13	2	15.4	15	0	0	15	6	20
28	10	6	60	9	2	22.2	10	0	0	10	3	30
35	5	5	100	5	2	40	5	1	20	5	1	40

TABLA VI. Porcentaje de tumores ulcerados en los diferentes lotes.

AN. = Número de animales; UL = Número de animales con úlceras en el tumor

TIEMPO POST-INJERTO	RATONES +/-	% DE PRENDIMIENTO	OBSERVACIONES
DIA 0	0/10	--	injerto de un millón de cel
DIA 4	3/5	37.5	2 animales muertos
DIA 7	8/8	100	

TABLA VII. Prendimiento de la forma ascítica

TIEMPO POST-INJERTO	RATONES +/-	% DE PRENDIMIENTO
0	0/100	0
7	71/100	71
14	92/100	92
21	92/100	92
28	92/100	92
35	92/100	92

TABLA VIII. Prendimiento de la forma sólida

DIA	0	7	14	21	28	35
G	32.5	40.0	43.2	50.7		
R	43.7	34.0	39.7	45.6		
U 1	31.8	32.6	37.4	37.3		
P	29.6	29.8	35.6	35.6		
O	28.2	28.5	36.9	36.7		
G	31.9	30.5	44.9	50.1	48.3	
R	33.6	36.5	38.3	45.5	45.2	
U 2	30.1	34.0	40.1	43.6	44.0	
P	38.2	42.6	50.0	67.1	62.4	
O	26.4	28.9	33.4	36.9	36.2	
G	32.2	31.8	40.6	51.0	52.2	49.8
R	33.4	36.3	40.0	49.6	47.1	45.5
U 3	30.8	37.2	43.5	57.6	57.3	57.3
P	29.9	36.1	40.9	42.4	40.4	40.7
O	37.6	43.2	51.2	64.9	63.0	62.1
MEDIA	32.2	34.8	40.3	47.6	49.6	51.1

TABLA IX. Peso en gramos de los ratones. Lote I

DIA	0	7	14	21	28	35
G	29.6	31.2	37.3	44.2		
R	33.2	39.1	41.6	36.6		
U 1	30.1	34.6	39.5	42.0		
P	35.6	34.7	38.7	41.2		
O	33.0	38.2	45.9	43.0		
G	48.0	53.0	54.1	54.2	54.2	
R	26.6	31.0	33.0	36.0	37.0	
U 2	29.9	32.2	37.6	37.6	37.4	
P	31.1	37.1	37.4	39.1	39.1	
O	32.2	36.9	38.1	39.0	39.0	
G	30.1	35.5	40.3	42.1	42.3	42.0
R	30.0	37.9	43.6	45.5	45.8	45.8
U 3	29.6	37.2	40.1	41.7	41.9	41.7
P	31.2	33.1	43.3	41.2	41.4	41.3
O	31.3	38.0	43.1	42.0	42.1	42.1
MEDIA	31.9	36.6	40.9	42.5	43.1	44.8

TABLA X. Peso en gramos de los ratones del lote B

DIA	0	7	14	21	28	35
G	37.3	39.1	43.9	MUERTO		
R	33.2	30.2	34.5	38.9		
U 1	30.1	31.9	36.4	37.1		
P	28.2	31.6	44.3	46.8		
O	28.2	31.6	37.2	40.9		
G	32.2	32.2	38.6	44.3	44.1	
R	32.6	40.0	49.3	47.2	46.9	
U 2	32.5	37.1	45.0	MUERTO		
P	31.7	30.8	39.1	48.8	48.9	
O	33.4	36.0	38.1	46.3	45.6	
G	33.8	37.2	43.0	46.7	46.7	46.7
R	35.2	39.2	47.8	49.8	48.1	48.6
U 3	29.1	35.4	42.1	54.1	43.2	42.8
P	28.0	29.6	40.5	36.6	36.6	36.6
O	31.3	38.0	43.1	42.0	42.1	42.1
MEDIA	32.3	35.17	41.51	44.5	44.6	43.3

TABLA XI. Peso en gramos de los ratones del lote C

DIA	0	7	14	21	28	35
G	35.5	36.9	40.5	42.1		
R	37.2	37.8	44.2	45.9		
U 1	28.6	32.3	35.5	36.6		
P	32.3	37.4	41.4	40.2		
O	27.9	29.0	33.8	31.5		
G	34.8	37.2	41.5	42.3	42.5	
R	37.6	36.2	39.9	41.9	41.9	
U 2	31.6	37.7	42.7	42.7	42.6	
P	35.5	36.1	43.5	43.1	43.5	
O	32.7	38.4	41.8	42.4	42.4	
G	36.7	38.9	42.5	42.4	42.6	42.3
R	27.6	28.9	35.1	35.6	35.4	35.3
U 3	28.5	31.6	33.8	34.2	34.2	34.6
P	29.8	29.8	33.4	33.5	33.5	33.8
O	31.1	32.3	34.1	34.0	34.0	34.1
MEDIA	32.4	32.3	38.9	39.2	39.3	36.0

TABLA XII. Peso en gramos de los ratones del lote C+E

DIA	0	7	14	21	28	35
G	SI	0.26	6.15	11.86		
R	SI	0.08	2.19	12.01		
U 1	SI	SI	0.41	4.34		
P	SI	SI	0.68	2.71		
O	SI	0.05	0.55	4.23		
G	SI	0.57	6.77	12.84	27.59	
R	SI	0.18	1.10	10.74	13.74	
U 2	SI	0.05	1.29	13.18	13.54	
P	SI	0.54	11.48	19.59	20.94	
O	SI	SI	0.38	6.44	9.28	
G	SI	0.25	6.07	14.96	21.96	22.12
R	SI	0.11	3.05	12.87	20.68	20.68
U 3	SI	0.22	3.05	23.52	25.91	27.43
P	SI	0.09	1.28	10.19	12.30	25.04
O	SI	0.54	16.39	21.43	26.64	23.61
MEDIA	SI	0.20	4.05	12.26	18.58	23.77

TABLA XIII. Volúmenes tumorales, en cc. del lote I

SI = tumor palpable pero no medible

DIA	0	7	14	21	28	35
G	SI	SI	0.04	0.20		
R	SI	0.28	2.03	1.86		
U 1	SI	0.21	4.02	2.32		
P	SI	0.10	3.00	2.32		
O	SI	1.83	3.34	4.52		
G	SI	0.12	3.12	2.43	2.43	
R	SI	0.54	2.40	2.41	2.41	
U 2	SI	SI	3.67	3.67	2.35	
P	SI	0.42	7.68	6.85	6.70	
O	SI	0.13	4.43	3.70	0.87	
G	SI	0.33	4.26	4.18	3.80	2.67
R	SI	0.22	2.94	0.16	0.12	SI
U 3	SI	0.55	4.40	3.48	3.48	3.34
P	SI	SI	1.02	0.78	0.54	0.42
O	SI	0.12	5.60	3.75	3.37	3.04
MEDIA	SI	0.32	3.46	2.85	2.60	2.56

TABLA XIV. Volúmenes tumorales, en cc. del lote B

SI = Tumoración palpable pero no medible

DIA	0	7	14	21	28	35
G	SI	0.26	7.88	MUERTO		
R	SI	0.13	5.19	3.69		
U 1	SI	0.20	7.72	9.81		
P	SI	0.25	5.79	5.11		
O	SI	1.01	3.46	2.81		
G	SI	0.94	2.77	2.24	1.43	
R	SI	0.42	3.13	3.02	2.24	
U 2	SI	0.14	0.66	MUERTO		
P	SI	0.43	5.92	5.50	3.92	
O	SI	0.16	1.76	1.47	0.89	
G	SI	0.80	6.08	5.34	2.04	2.04
R	SI	0.18	4.01	3.81	2.24	1.85
U 3	SI	0.89	7.26	5.55	3.02	3.04
P	SI	1.20	3.92	3.87	2.36	1.90
O	SI	0.64	4.11	2.11	1.40	0.94
MEDIA	SI	0.51	4.64	3.62	1.92	1.92

TABLA XV. Volumenes tumorales, en cc, del lote C

SI = Tumoración palpable pero no medible

DIA	0	7	14	21	28	35
G	SI	0.50	6.67	5.39		
R	SI	0.07	8.09	3.02		
U 1	SI	0.10	3.22	1.13		
P	SI	0.23	2.32	1.67		
O	SI	SI	3.38	SI		
G	SI	0.23	5.92	3.02	2.81	
R	SI	0.10	4.39	4.16	2.19	
U 2	SI	0.06	6.13	2.32	0.23	
P	SI	0.37	4.43	1.67	0.87	
O	SI	0.63	8.09	3.89	0.36	
G	SI	0.73	8.05	4.04	1.67	0.47
R	SI	0.12	2.30	0.27	0.16	0.11
U 3	SI	0.04	1.12	SI	-	-
P	SI	0.06	3.66	1.67	SI	-
O	SI	0.07	5.60	1.13	0.10	0.10
MEDIA	SI	0.22	4.89	2.22	0.94	0.14

TABLA XV. Volumenes tumorales, en cc. del lote T

SI = Tumoración palpable pero no medible. - = remisión total

DIA	SEMANA DE TRATAMIENTO	LOTE B	LOTE C	LOTE C+B
21	1	0.77	0.70	0.82
28	2	0.86	0.89	0.94
35	3	0.89	0.89	0.99

TABLA XVII. Indice de inhibición del volumen tumoral

	T1	T2	T3	C1	C2	C3	B1	B2	B3	CB1	CB2	CB3
	9.5	10.8	11.0	/	5.3	7.8	9.7	7.9	7.9	9.2	6.3	6.6
	6.0	10.3	14.6	8.8	6.0	7.7	6.6	6.6	5.2	8.3	4.1	5.2
	8.6	10.5	10.8	5.3	/	6.3	3.8	5.7	3.1	9.1	-	-
	9.6	12.2	16.3	7.9	10.4	7.9	6.2	7.0	5.3	1.8	4.0	-
	9.1	11.7	12.0	7.0	8.0	7.0	5.9	5.9	6.3	10.5	5.0	4.7
Media	8.6	11.1	12.6	7.3	7.5	7.3	5.0	5.7	5.6	7.8	3.8	3.3

TABLA XVII. Número medio de mitosis por campo de 400 aumentos

TABLA XVIII. Número de hematies y leucocitos por mm³

LOTE TESTIGO (Día 0)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	8.010.000	7.960.000	8.230.000
LEUCOCITOS	5.600	4.900	6.100
HEMATIES	8.230.000	6.390.000	7.560.000
LEUCOCITOS	5.200	3.150	6.150

MEDIA DE HEMATIES: 7.730.000

MEDIA DE LEUCOCITOS: 5.183

LOTE CISPLATINO (Día 0)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	7.320.000	7.460.000	8.130.000
LEUCOCITOS	5.600	5.600	4.800
HEMATIES	8.100.000	6.920.000	7.940.000
LEUCOCITOS	6.150	4.900	4.650

MEDIA HEMATIES: 7.645.000

MEDIA LEUCOCITOS: 5.283

TABLA XVIII. Número de hematíes y leucocitos por mm³
(continuación).

LOTE BLEOMICINA (Día 0)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	7.150.000	8.210.000	8.020.000
LEUCOCITOS	3.900	4.300	6.100
HEMATIES	6.950.000	7.310.000	7.590.000
LEUCOCITOS	4.650	4.700	5.100

MEDIA DE HEMATIES: 7.538.333

MEDIA DE LEUCOCITOS 4.792

LOTE CISPLATINO+BLEOMICINA (Día 0)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	8.430.000	7.530.000	7.300.000
LEUCOCITOS	4.950	4.350	5.150
HEMATIES	7.110.000	6.940.000	7.030.000

MEDIA HEMATIES: 7.390.000

MEDIA LEUCOCITOS: 5.212

TABLA XVIII. Número de hematíes y leucocitos por mm³
(continuación)

LOTE TESTIGO (Día 14)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	6.500.000	6.270.000	5.120.000
LEUCOCITOS	4.150	4.450	3.940
HEMATIES	7.160.000	6.840.000	6.720.000
LEUCOCITOS	5.860	4.500	4.650

MEDIA HEMATIES: 6.435.000

MEDIA LEUCOCITOS: 4.583

LOTE CISPLATINO (Día 14)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	6.370.000	7.640.000	6.840.000
LEUCOCITOS	3.940	4.900	4.200
HEMATIES	6.990.000	6.310.000	6.590.000
LEUCOCITOS	4.400	4.150	4.550

MEDIA HEMATIES: 6.790.000

MEDIA LEUCOCITOS: 4.356.6

TABLA XVIII. Número de hematíes y leucocitos por mm³.

(continuación)

LOTE BLEOMICINA (Día 14)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	6.420.000	6.340.000	7.070.000
LEUCOCITOS	5.660	4.850	6.050
HEMATIES	7.720.000	6.800.000	6.710.000
LEUCOCITOS	5.850	4.650	6.050

MEDIA HEMATIES: 6.843.333

MEDIA LEUCOCITOS: 5.518.3

LOTE CISPLATINO + BLEOMICINA (Día 14)

GRUPO	1	2	3
HEMATIES	7.430.000	6.550.000	6.810.000
LEUCOCITOS	4.550	5.150	5.950
HEMATIES	7.060.000	6.430.000	6.880.000
LEUCOCITOS	5.845	4.550	3.940

MEDIA HEMATIES: 6.860.000

MEDIA LEUCOCITOS: 4.995.8

TABLA XVIII. Número de hematies y leucocitos por mm³.
(continuación)

LOTE TESTIGO (Día 28)

GRUPO	1	2
HEMATIES	6.000.000	5.520.000
LEUCOCITOS	3.800	4.550
HEMATIES	5.100.000	5.230.000
LEUCOCITOS	5.600	4.650

MEDIA HEMATIES: 5.426.500

MEDIA LEUCOCITOS: 4.650

LOTE CISPLATINO (Día 28)

GRUPO	1	2
HEMATIES	6.380.000	6.080.000
LEUCOCITOS	4.400	3.350
HEMATIES	5.970.000	5.280.000
LEUCOCITOS	5.600	4.200

MEDIA HEMATIES: 5.927.500

MEDIA LEUCOCITOS: 4.437,5

TABLA XVIII. Número de hematies y leucocitos por mm³.(continuación)

LOTE BLEOMICINA (Día 28)

GRUPO	1	2
HEMATIES	7.590.000	6.800.000
LEUCOCITOS	6.050	4.200
HEMATIES	7.880.000	7.100.000
LEUCOCITOS	5.600	4.400

MEDIA HEMATIES: 7.342.500

MEDIA LEUCOCITOS: 5.062,5

LOTE CISPLATINO + BLEOMICINA (Día 28)

GRUPO	1	2
HEMATIES	7.360.000	7.840.000
LEUCOCITOS	4.900	4.650
HEMATIES	7.090.000	6.840.000

MEDIA HEMATIES: 7.225.500

MEDIA LEUCOCITOS: 4.825

TABLA XIX. Formulas leucocitarias (expresadas en %)

DIA 0					
	LINF	MONO	BAS	EOSIN	NEUTR
LOTE TESTIGO	70	1	0	0	29
	89	4	0	1	6
	63	6	1	2	27
	79	3	0	5	13
	81	4	0	0	15
	86	1	0	0	15
MEDIAS.....	78	3.1	0.2	1.3	17.5
LOTE CISPLAT.	74	4	0	0	22
	79	6	0	1	14
	72	3	0	0	23
	88	5	1	0	6
	70	3	0	0	27
	74	7	1	0	19
MEDIAS.....	76.2	4.7	0.3	0.2	18.5
LOTE BLEOMIC.	70	2	0	0	28
	80	4	0	0	16
	92	0	0	0	8
	83	5	0	0	12
	73	6	0	1	20
	75	2	1	0	22
MEDIAS.....	78.8	3.2	0.2	0.2	17.6
LOTE CIS+BLEO	79	3	0	0	18
	77	3	1	1	18
	71	2	1	1	25
	90	0	0	0	10
	63	2	0	0	35
	86	3	0	0	11
MEDIAS.....	77.7	2.2	0.3	0.3	19.5

TABLA XIX. Fórmulas leucocitarias (expresadas en %)

DIA 14					
	LINF	MON	BAS	EOSIN	NEUTR
LOTE TESTIGO	79	1	0	0	20
	81	2	0	1	16
	77	0	0	1	22
	64	2	0	0	34
	78	4	1	0	17
	73	2	0	0	25
MEDIAS	75.3	1.8	0.2	0.3	22.3
LOTE CISPLATINO	72	1	1	0	26
	75	0	0	0	25
	86	3	0	1	10
	91	1	0	0	8
	79	2	0	1	17
	60	5	0	0	35
MEDIAS.....	77.2	2	0.2	0.3	20.2
LOTE BLEOMICINA	82	0	1	1	16
	69	1	0	1	29
	76	2	0	0	22
	63	1	0	0	36
	45	6	0	0	49
	74	3	1	2	20
MEDIAS.....	68.2	2.16	0.3	0.7	28.7
LOTE CIS + BLEO	63	3	1	0	33
	72	1	0	0	27
	91	1	0	0	8
	80	0	0	1	19
	70	3	1	1	25
	79	1	0	0	20
MEDIAS	75.8	1.5	0.3	0.3	22

TABLA XIX. Fórmulas leucocitarias (expresadas en %)

DIA 28

	LINFO	MONO	BAS	EOS	NEUTR
LOTE TESTIGO	85	3	0	0	12
	61	1	0	0	38
	74	1	0	0	23
	71	0	0	0	29
MEDIAS.....	73.25	1.2	0	0	25.5
LOTE CISPLATINO	73	1	1	0	25
	69	2	0	1	28
	81	2	0	0	17
	64	3	1	0	30
MEDIAS.....	72.25	1.3	0.5	0.2	25
LOTE BLEOMICINA	80	2	0	2	16
	74	3	0	0	23
	71	1	0	3	25
	77	1	1	0	21
MEDIAS.....	75.5	1.75	0.2	1.2	21.2
LOTE CIS + BLEO	78	1	0	0	21
	79	3	0	0	18
	80	1	0	0	19
	75	0	0	1	24
MEDIAS.....	77	1.2	0	0.2	20.5

	LOTE T	LOTE C	LOTE B	LOTECB
Error standard	5.44	0.04	1.76	1.73
Coef correlación	0.79	-0.53	-0.28	-0.71
F experimental	71.98	16.29	3.79	43.68
F teorico	1.6	1.6	1.5	1.6

p = 0.05

TABLA XX. Estudio estadístico de los volúmenes tumorales en relación con el tiempo

Comparación	Diferencia medias	Error estand.	Rango	q teor.	q exp.	Conclusión
T - B	22.02	0.29	3	3.65	75.93	Si
T - C	22.12	0.29	2	3.0	76.26	Si
T - C+B	23.63	0.29	4	4.05	81.48	Si
B - C	0.08	0.29	2	3.0	0.27	No
B - C+B	1.43	0.29	2	3.0	4.93	Si
C - C+B	1.51	0.29	3	4.05	5.02	Si

TABLA XXI. Comparación de los volúmenes tumorales mediante la prueba de Newman-keuls.

Si = Existe diferencia estadísticamente significativa

No = No existe diferencia estadísticamente significativa

	LOTE T	LOTE C	LOTE B	LOTE C+B
Error estandard	1.64	1.48	1.73	2.77
Coef correlación	0.76	0.04	-0.21	-0.63
F experimental	17.73	0.02	0.64	8.59
F teórico	2.6	2.6	2.6	2.6

$p = 0.05$

TABLA XXII. Estudio estadístico del número de mitosis en relación con el tiempo.

Comparación	Diferencia medias	Error estand.	Rango	q teor	q exp.	Conclusion
T - B	7.0	1.20	3	3.65	5.83	Si
T - C	5.3	1.20	4	3.0	4.42	Si
T - C+B	9.3	1.20	4	4.05	7.75	Si
B - C	1.7	1.20	2	3.0	1.42	No
B - C+B	2.3	1.20	2	3.0	1.91	No
C - C+B	4.0	1.20	3	3.65	3.33	No

TABLA XXIII. Comparación del número de mitosis mediante la prueba de Newman-Keuls

Si = Existe diferencia estadísticamente significativa

No = No existe diferencia estadísticamente significativa



Figura 1. Imagen macroscópica del tumor original. Superficie lobulada, cápsula blanco-nacarada con áreas hemorrágicas.



Figura 2. Aspecto histológico del tumor original.
Células cúbicas de núcleo amplio y nucleolos evidentes.
Mitosis. H-E X 500

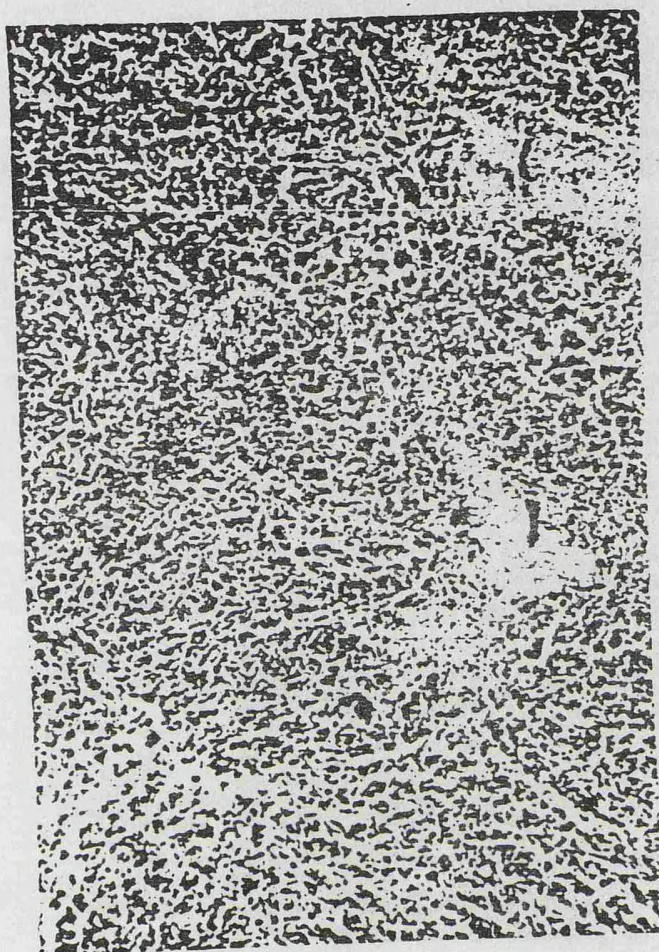


Figura 3. Tumor original. Áreas de necrosis. H-E X 50



Figura 4. Tumor original. profase explosiva. H-E X 500

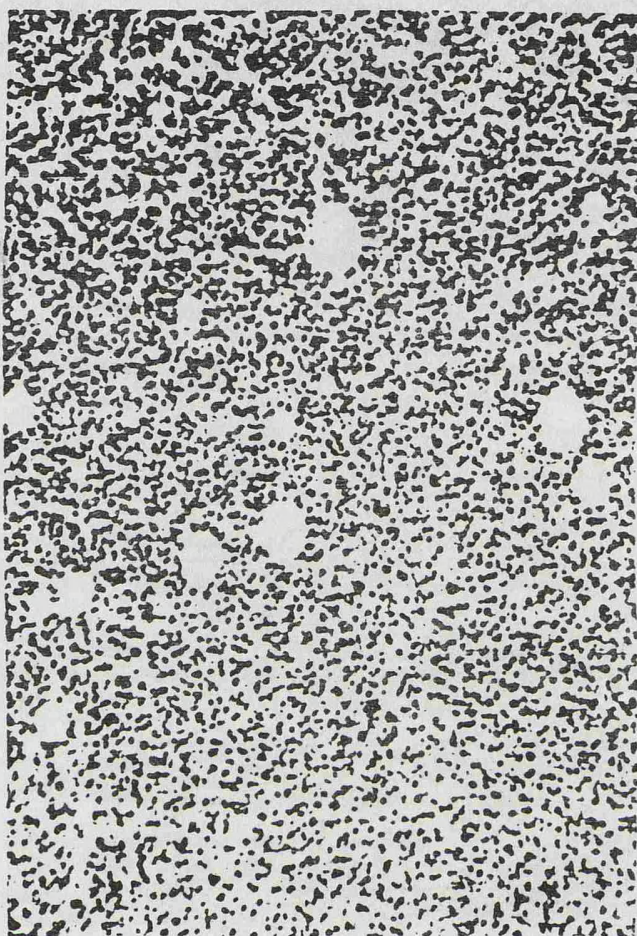


Figura 5. Aspecto histológico de los tumores del grupo T
1, imagen de carcinoma sólido. H-E X 120,5

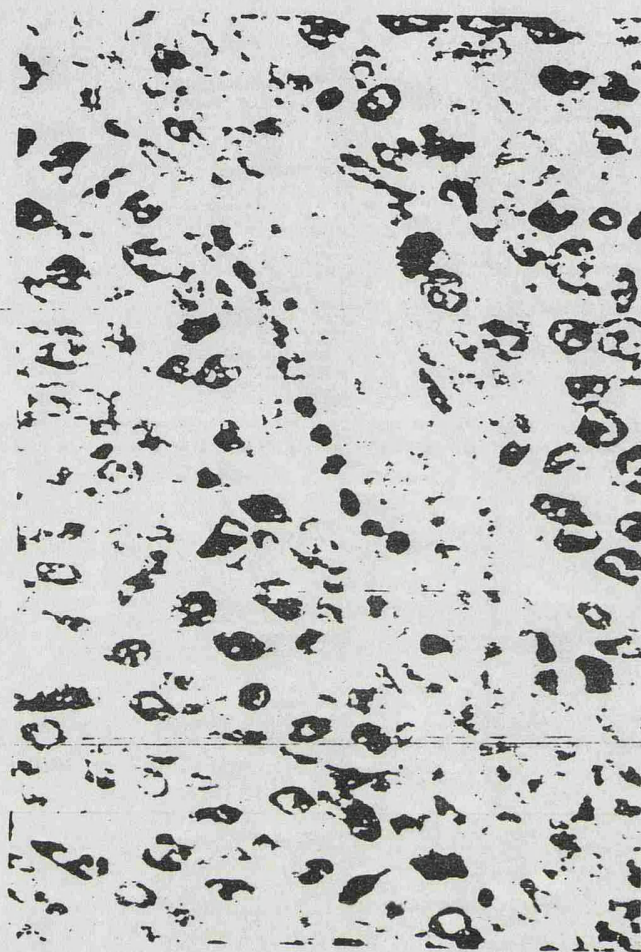


Figura 6. Areas hemorrágicas y hendiduras vasculares.

H-E X 500



Figura 7. T 2. Anisocitosis, H-E X 500



Figura 8. T 2. Anisocitosis, células multinucleadas y mitosis. H-E X 312,5

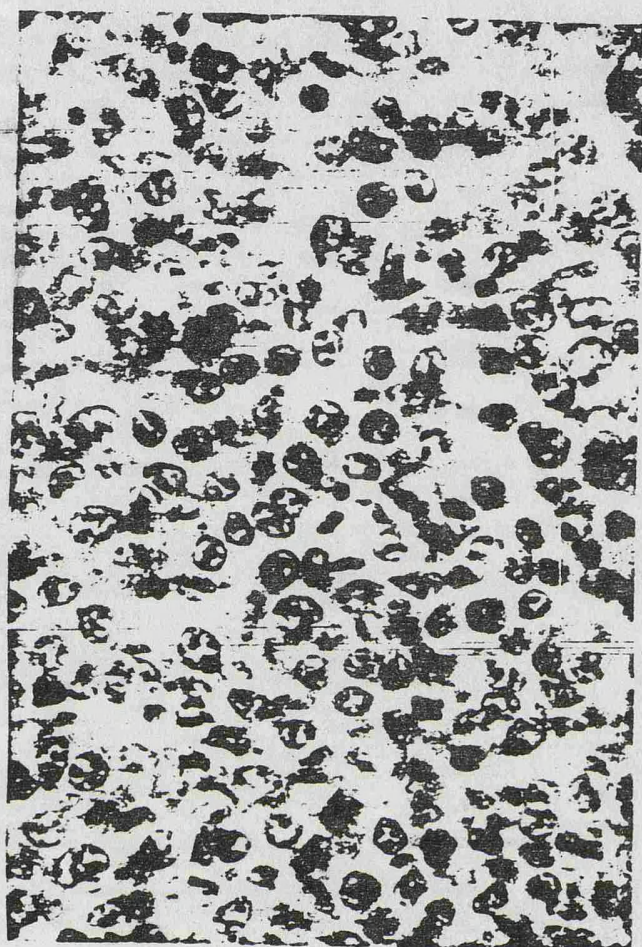


Figura 9. Diversas fases de la mitosis en un tumor del grupo T 2. H-E X 500

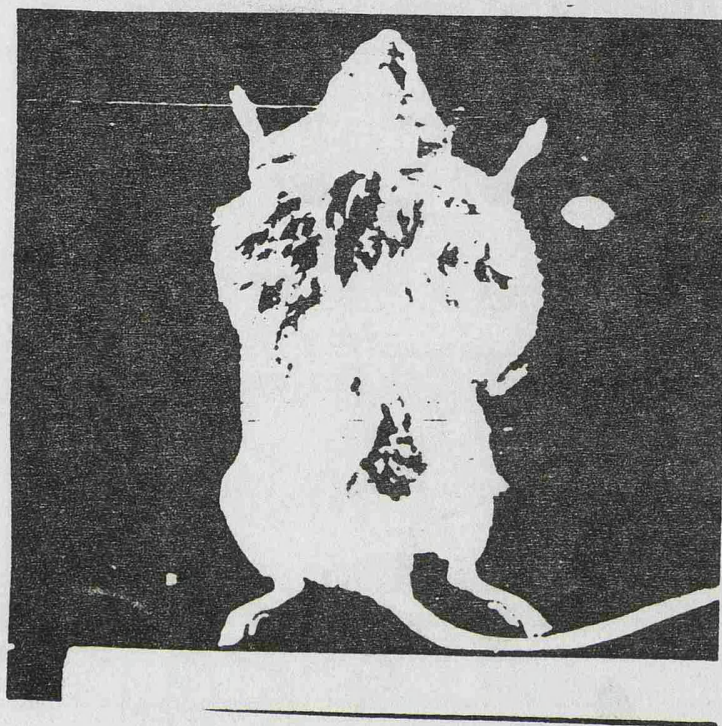


Figura 11. Ratones del grupo T 3 portador de tumores



Figura 12. Imagen histológica de un tumor del grupo 7 3.
Las células representan un grado de anisocitosis muy
elevado. P-E X 1.250



Figure 13. Image of solid carcinoma. H-E X 50

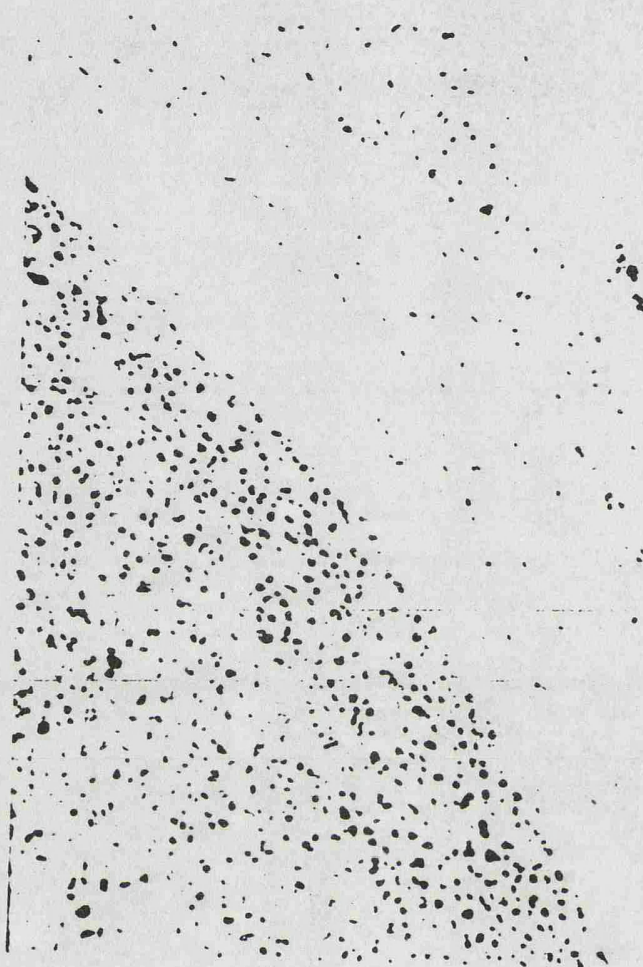


Figura 14. B 2. Cápsula de tejido conectivo laxo que rodea la neoplasia. H-E X 125

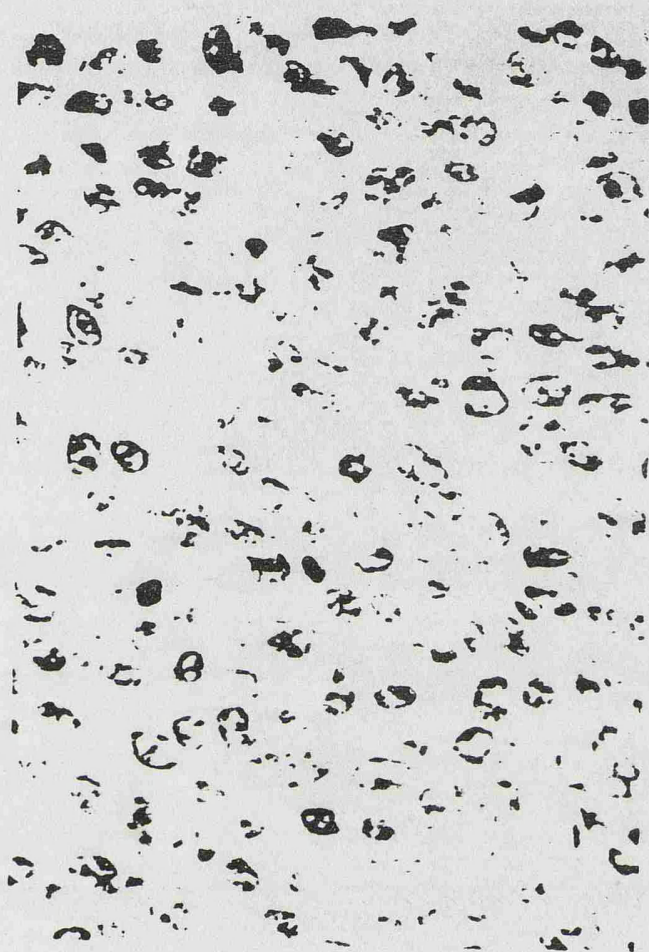


Figura 15. B 2. Anisocitosis moderada. H-E X 500

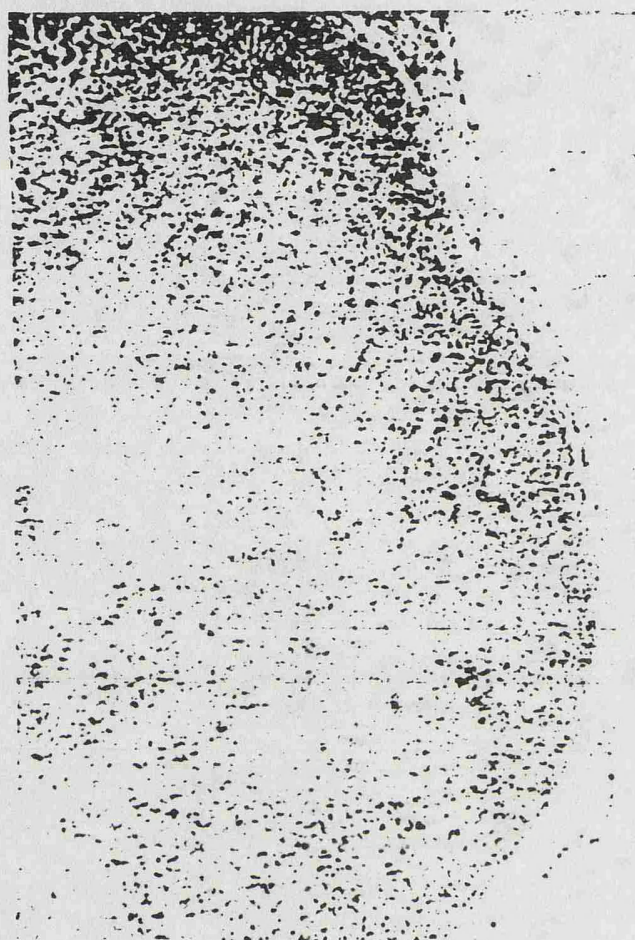


Figura 16. Áreas de necrosis de pequeño tamaño. H-E X 50



Figura 17. Areas hemorrágicas en la superficie de la neoplasia

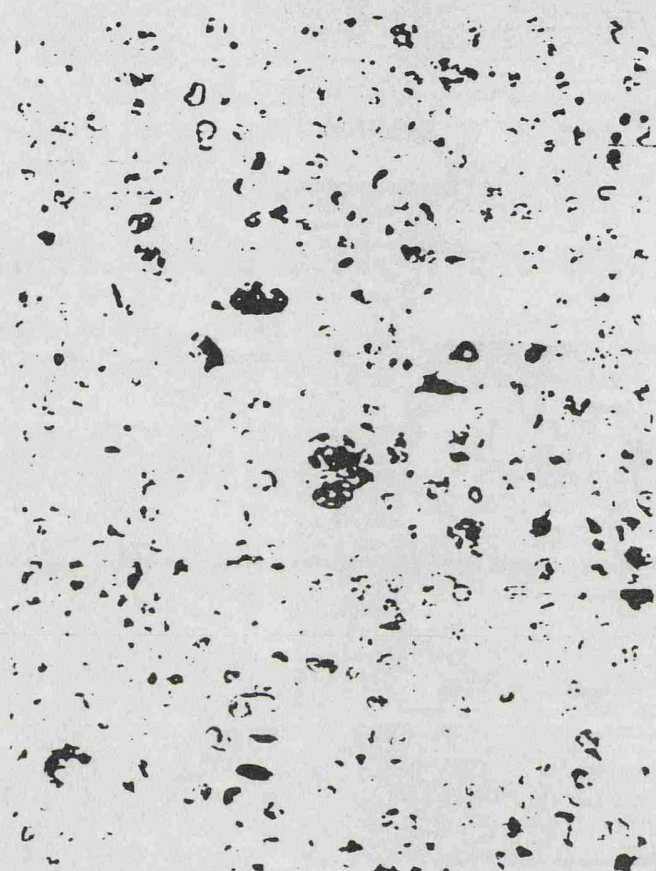


Figura 18. C. 1. Atípicas celulares y abundantes células gigantes multinucleadas. H-E X 500

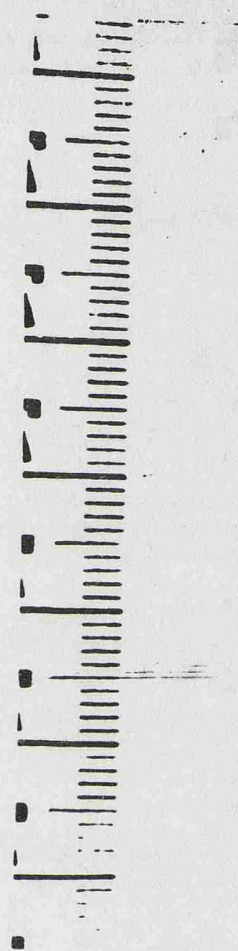


Figura 19, C 2. Superficie de sección de un tumor perteneciente al grupo C 2

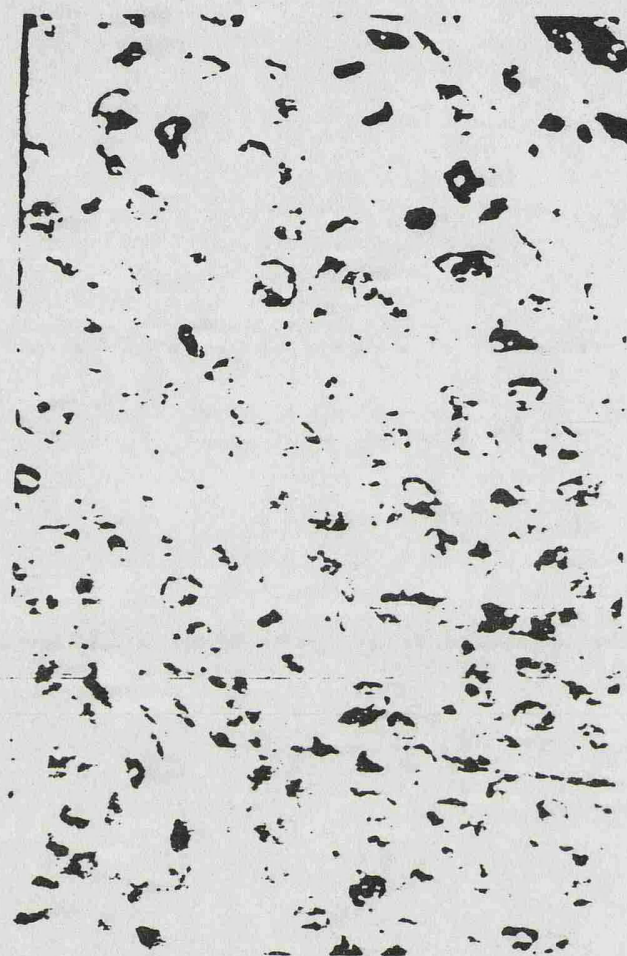


Figura 30. C 2. Anisocitosis. H-E x 500



Figura 21. C. 3. Células gigantes. H-E X 500



Figura 22. Imagen abigarrada de la superficie de sección de un tumor del grupo C+B 1

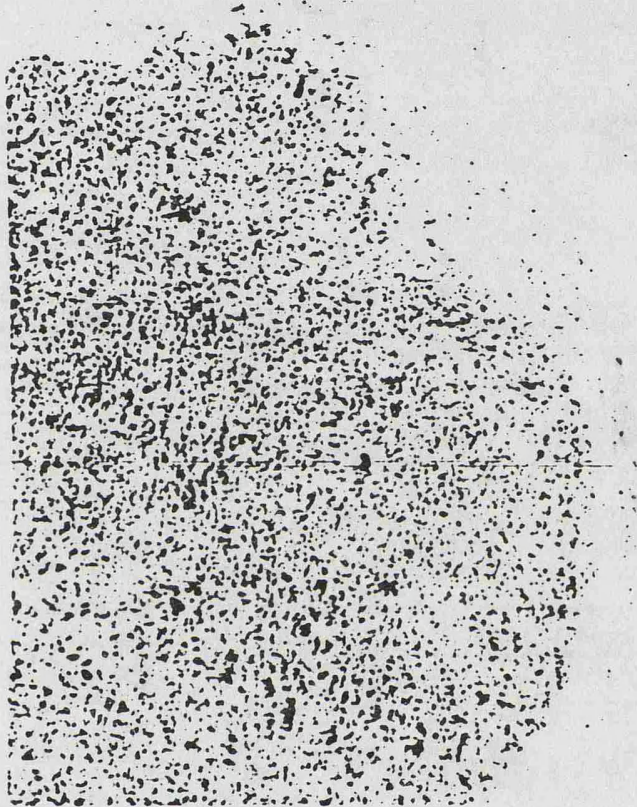


Figura 23. Aspecto histológico de un tumor del grupo C-3
1 rodeado por una cápsula de tejido conectivo. H-E X 50



Figura 24. C+B 3. Homogeneidad celular. H_E X 1.250

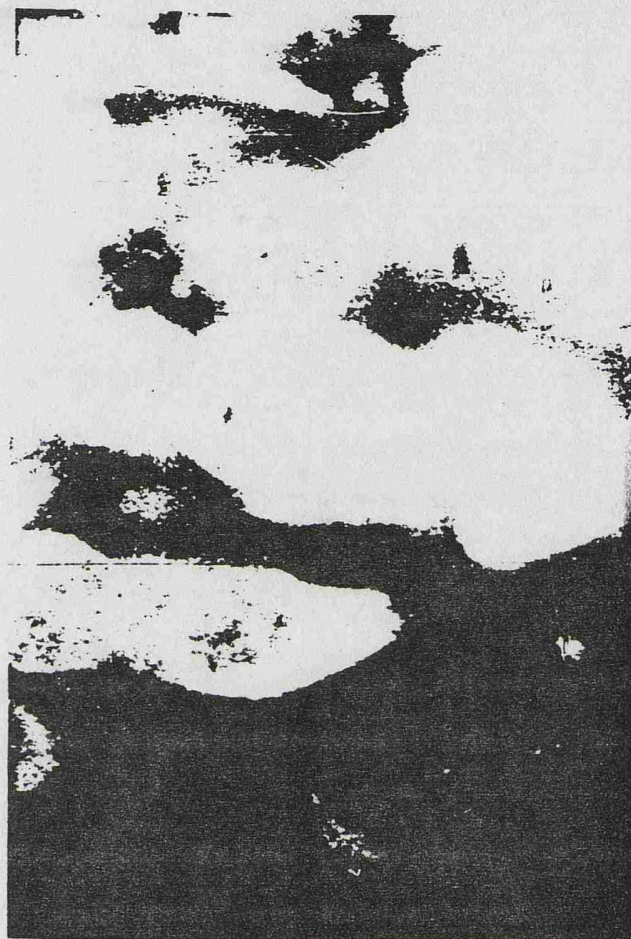


Figura 25. Positividad a la técnica de la I.F.I. con suero antiqueratinas. X 1.250



Figura 26. Positividad a la técnica de la I.F.I. con suero antiqueratinas.. X 500

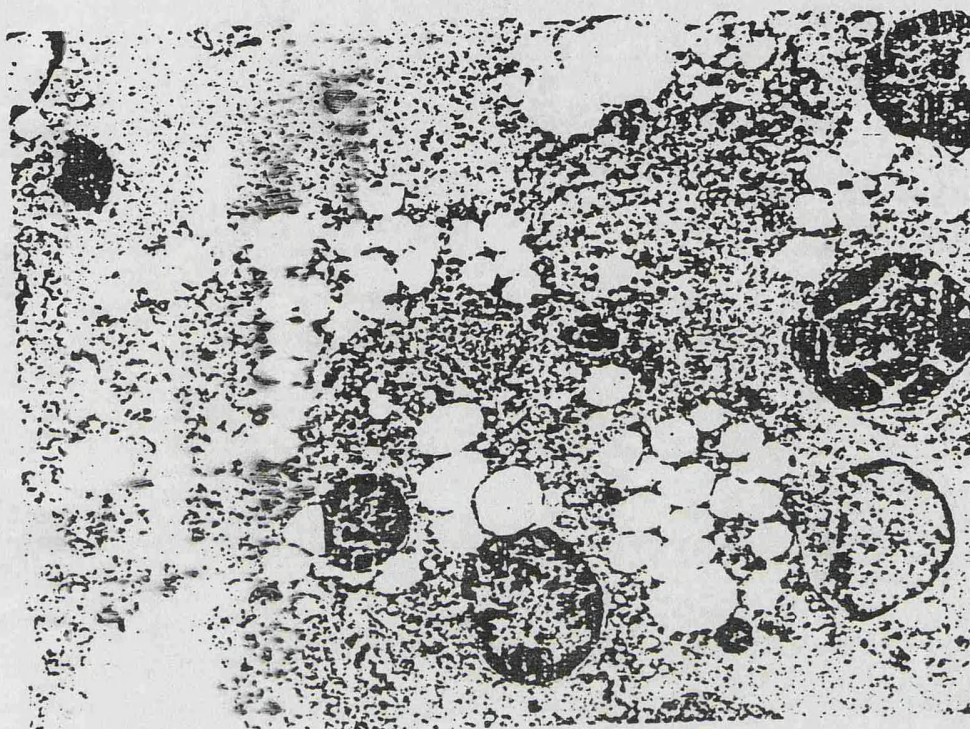


Figura 27. Pleomorfismo celular en un tumor del loba T.
Numerosas vacuolas intracitoplasmáticas. X 2000 en placa

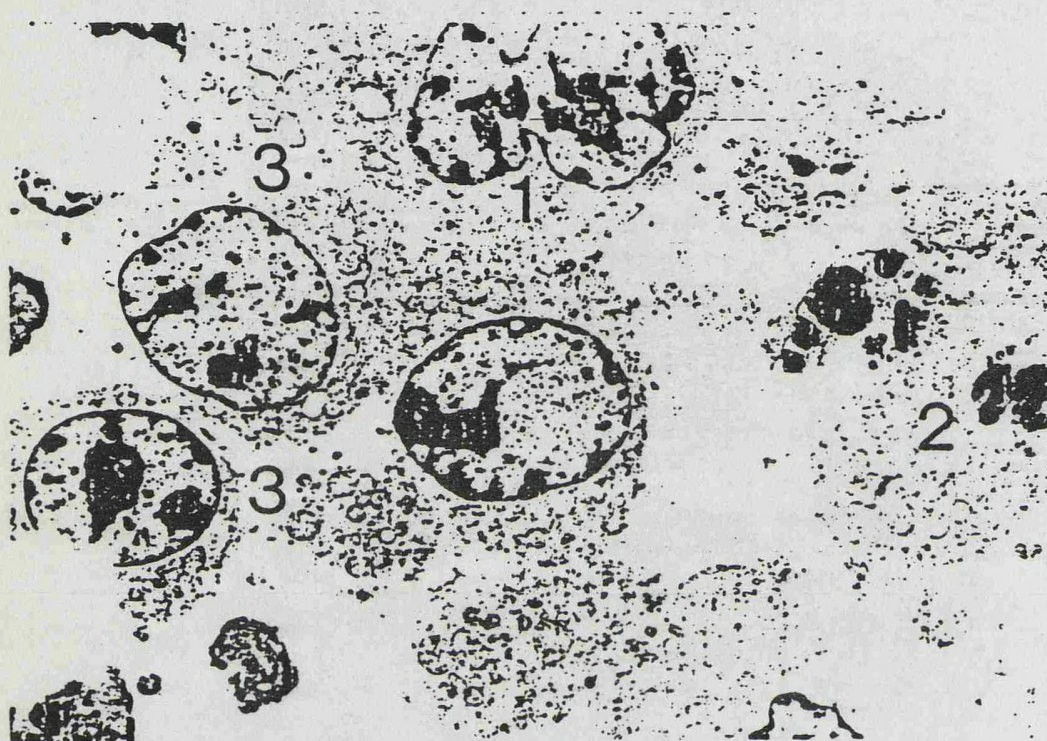


Figura 23. T . Amitosis (1), mitosis (2) / falta de cohesión celular (3). - X 1666 en placa

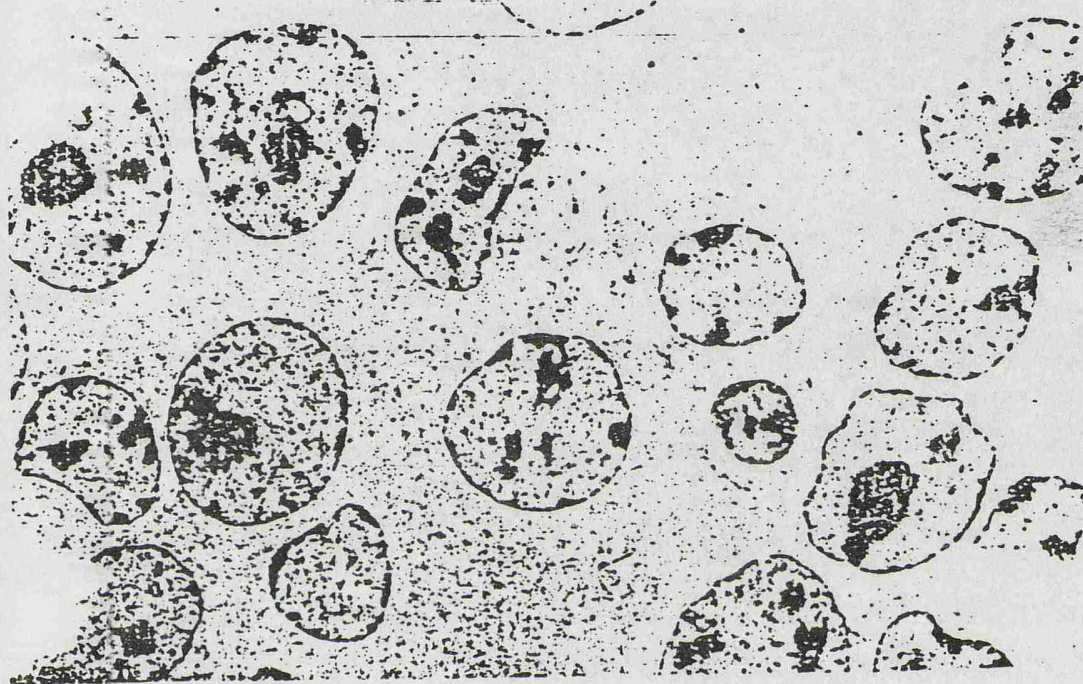


Figura 29.3. Pleomorfismo celular moderado. X 1666 en
place

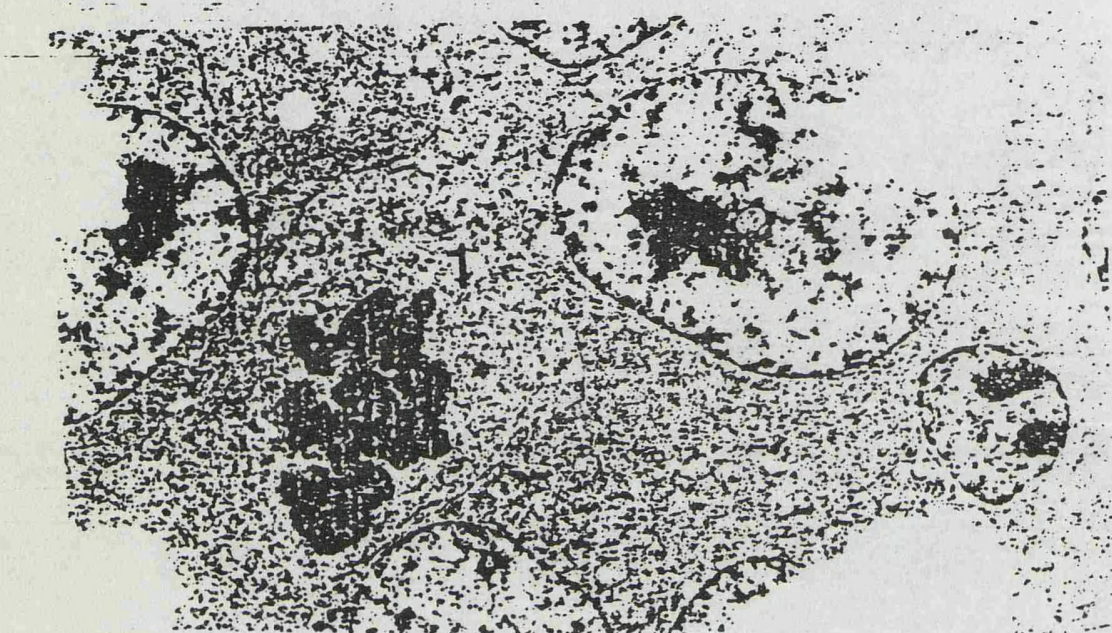


Figura 30. Células homogéneas con núcleos ovales
ricos en eucromatina . X 2000 en placa
Mitosis (1)



Figura 01. B. Núcleos con abundante eucromatina ,
profase explosiva. X 3333 en placa

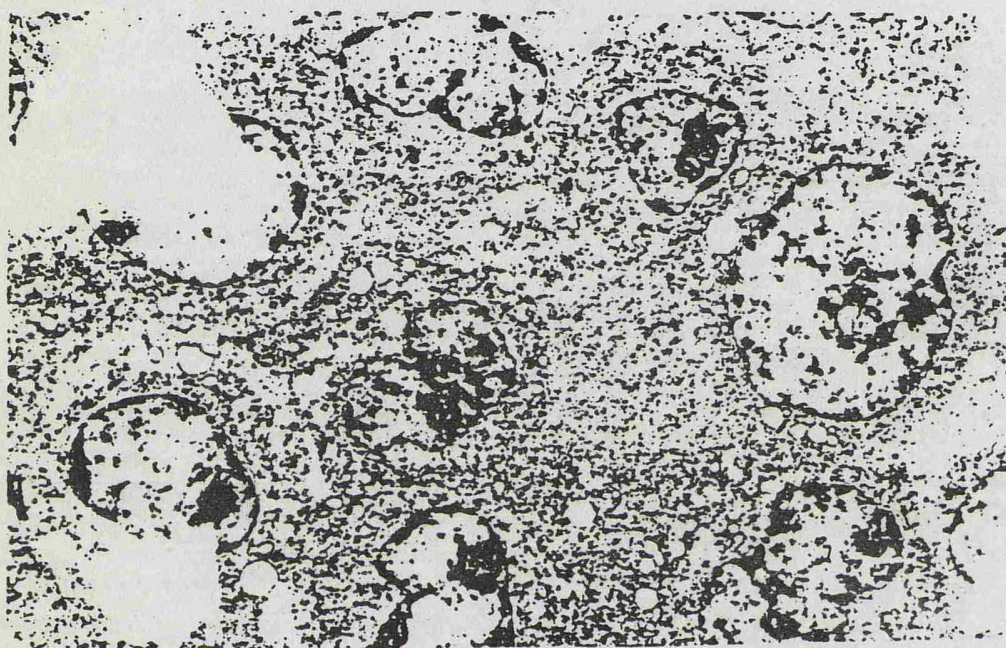


Figura 22. C. Integres de degeneración celular próximas
a un área de necrosis. X 1666 en placa

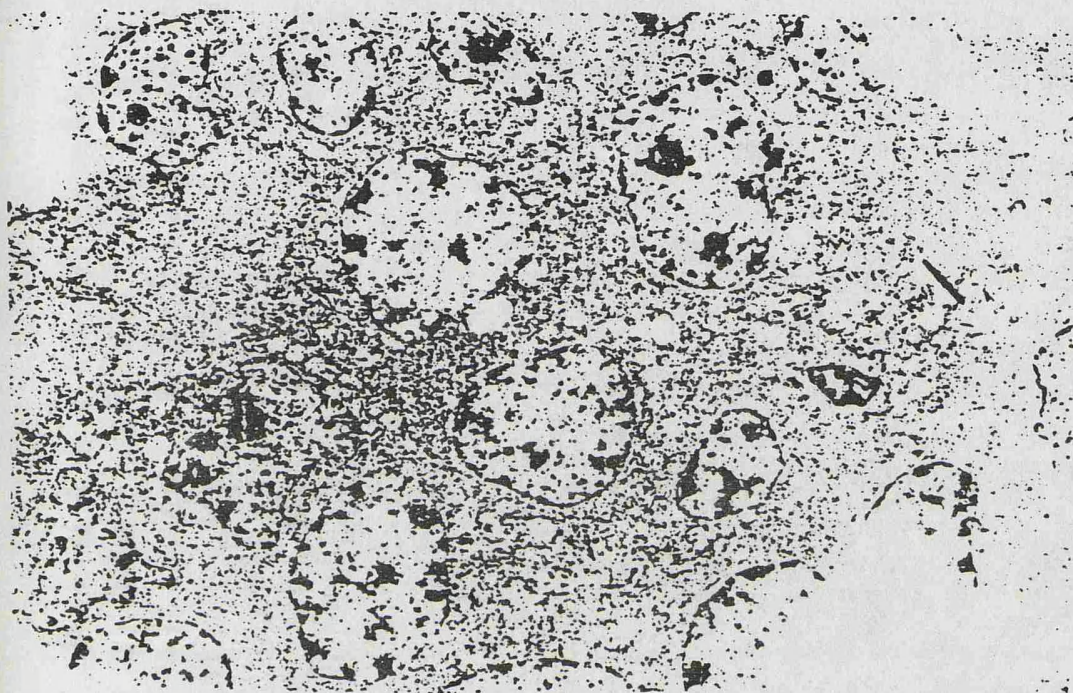


Figura 33. C+P. Moderado grado de anisocitosis. Células
en interfase. X 1333 ex place

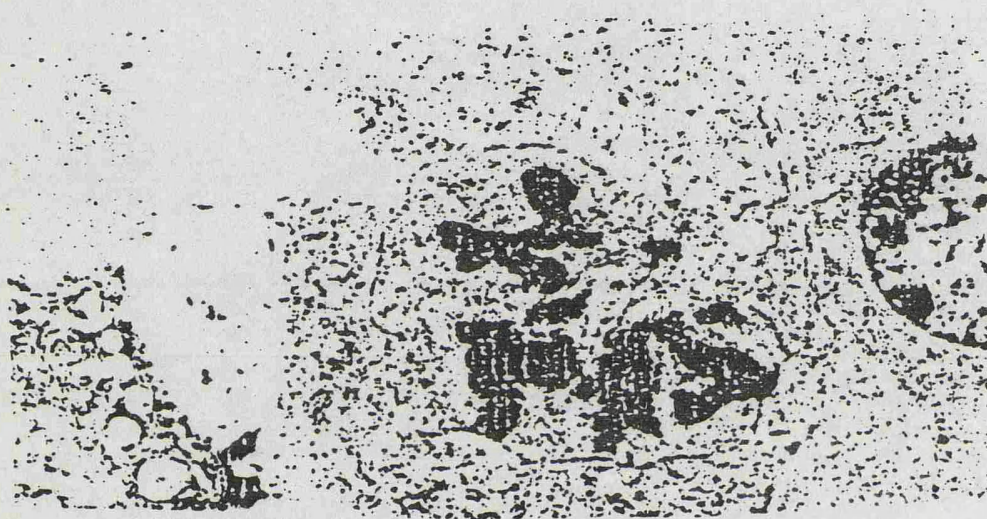
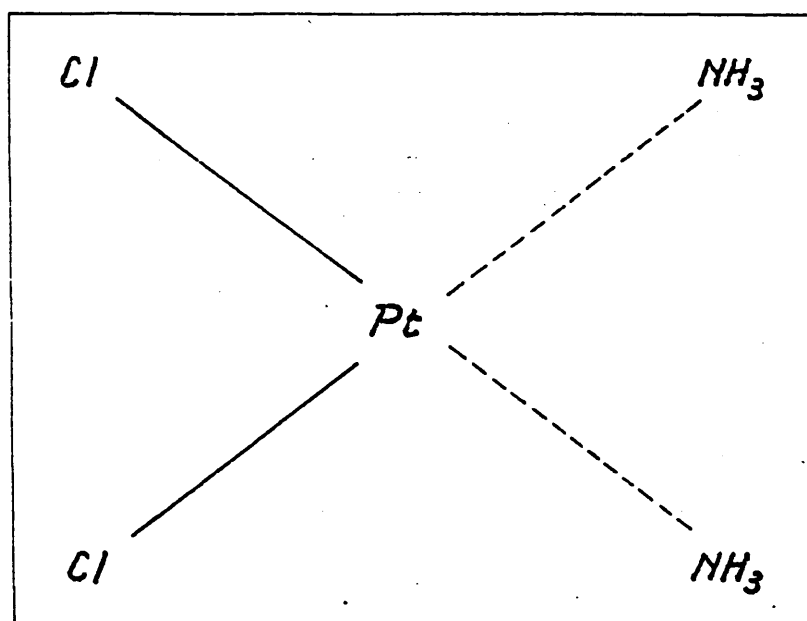
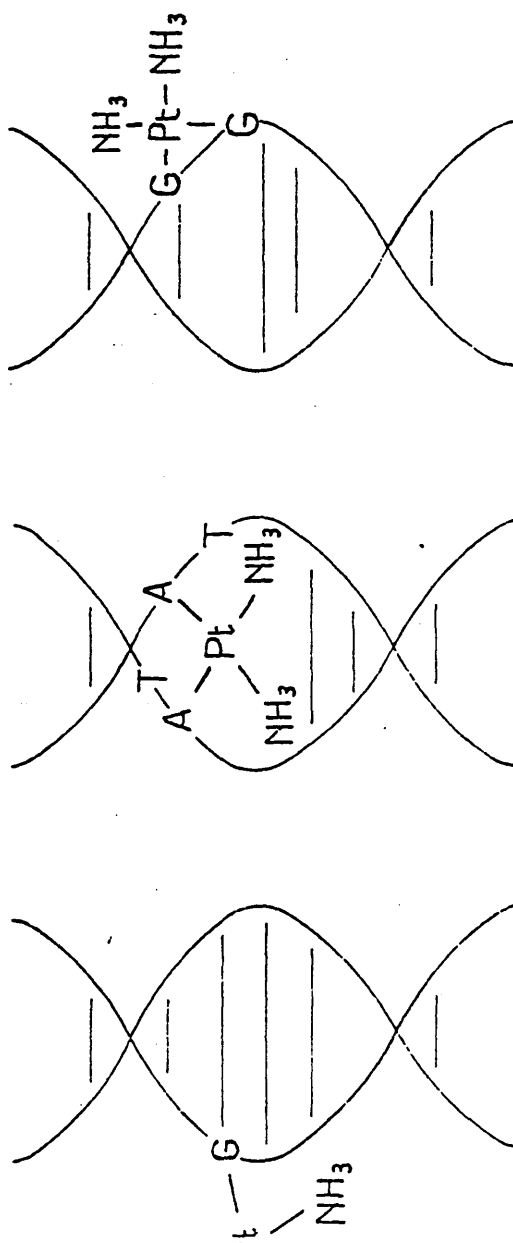


Figura 24. C-3. Mitosis (M). Células inflamatorias
alrededor de las células tumorales. X 2000 en placa

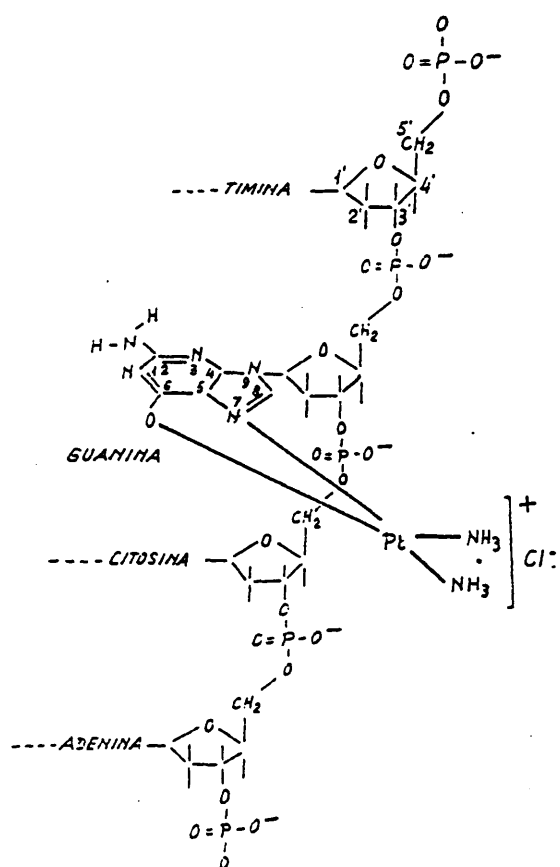
CISPLATINO
(*cis*-diaminodicloroplatino II)

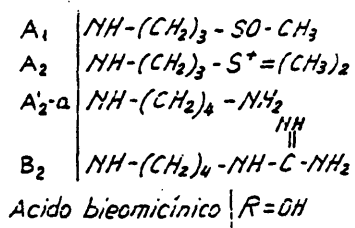
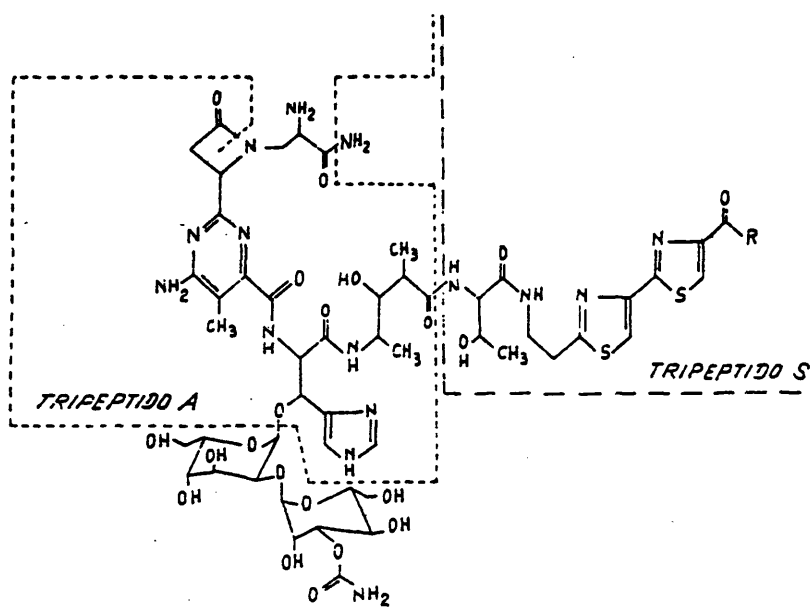


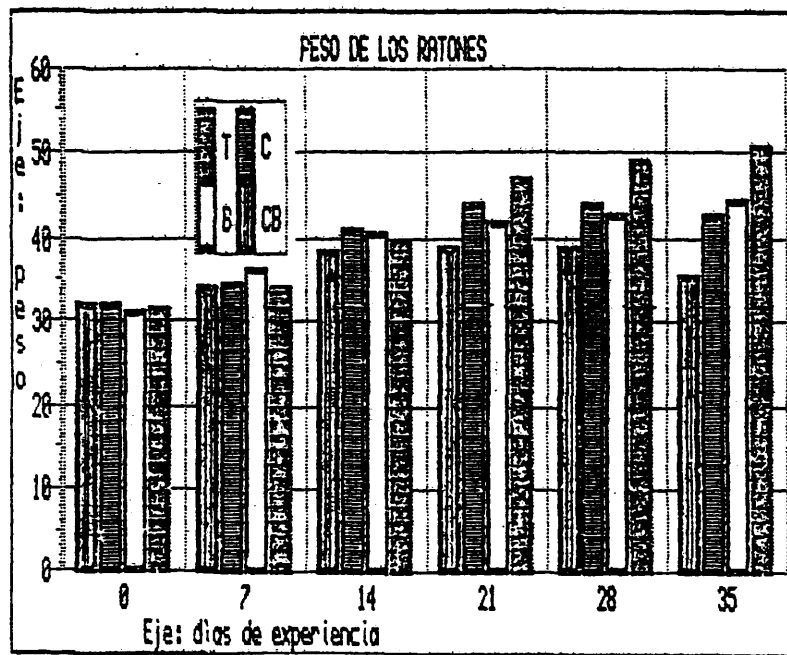
TIPOS POSIBLES DE INTERACCIONES DEL DNA CON CIS-PLATINO

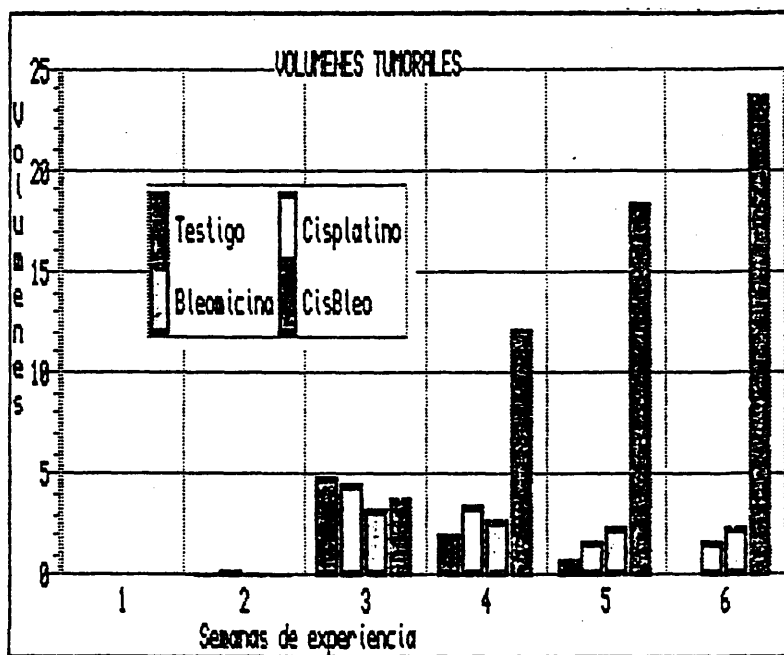


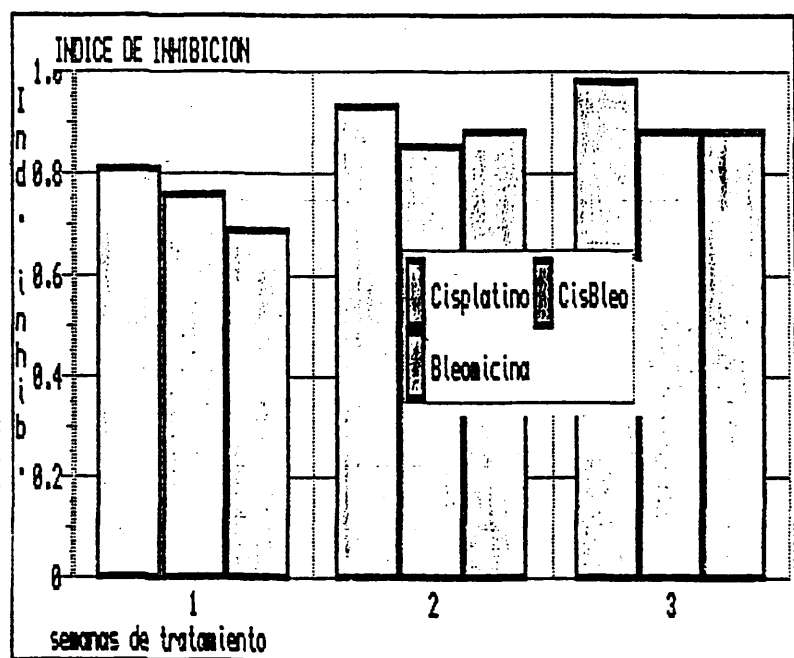
REPRESENTACION ESTRUCTURAL DE LA INTERACCION
ENTRE EL DNA Y CISPLATINO

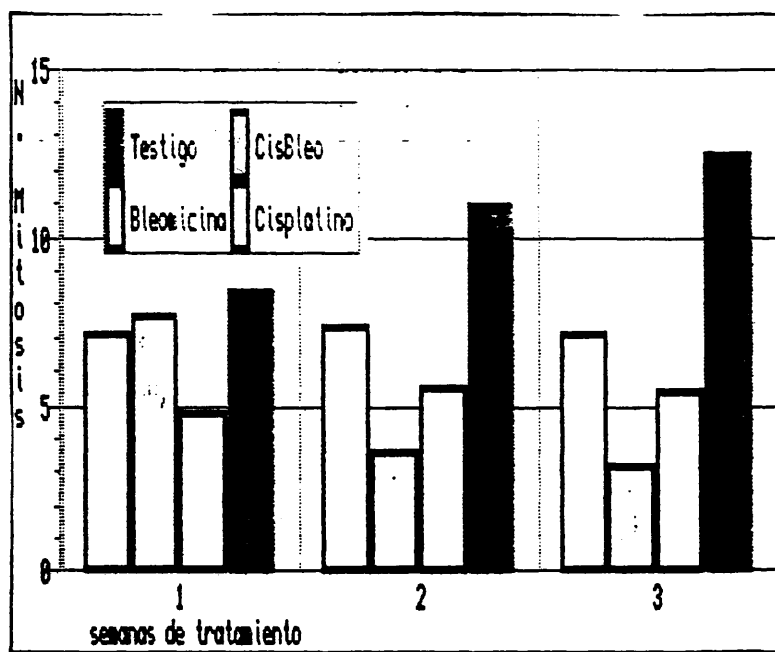












4

